

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ



БИОТЕХНОЛОГИЯ – ОТ НАУКИ К ПРАКТИКЕ

ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

(ПОСВЯЩЕННАЯ ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА НАИЛИ АХНЯФОВНЫ КИРЕЕВОЙ)

Том 1

23-26 сентября 2014 г.

г. Уфа

РИЦ БашГУ

2014

УДК 602
ББК 30.16
Б 63

*Печатается по решению кафедры биохимии и биотехнологии
ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»*

Редакционная коллегия:

д.б.н. Р.И. Ибрагимов (отв. ред.)
д.б.н. М.И. Гарипова
д.б.н. С.Ю. Веселов
д.б.н. Р.Г. Фархутдинов
к.б.н. И.А. Шпирная
к.б.н. В.О. Цветков
к.б.н. А.С. Григориади
к.б.н. Р.М. Баширова
к.б.н. И.А. Умаров

Биотехнология - от науки к практике:

Б 63 Материалы научных докладов участников Всероссийской конференции с международным участием, посвященной памяти профессора Киреевой Наиля Ахняфовны. Том 1.

(Уфа, Россия, 23-26 сентября 2014 г.). – Уфа:
Башкирский ГУ, 2014. – 214 с.
ISBN 978-5-7477-3641-2

В сборнике приведены материалы докладов участников Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология - от науки к практике». Статьи приводятся в авторской редакции. Авторы несут ответственность за патентную чистоту, достоверность и точность приведенных фактов, цитат, экономико-статистических данных, собственных имен, географических названий и прочих сведений, а также за разглашение данных, не подлежащих открытой публикации. Издание подготовлено при поддержке гранта РФФИ № 14-04-20229 на проведение конференции.

УДК 602
ББК 30.16
ISBN 978-5-7477-3641-2 © ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, 2014

Содержание первого тома

Новоселова Е.И. НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ. ВКЛАД ПРОФЕССОРА Н.А. КИРЕЕВОЙ В ИЗУЧЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ	8
Чемерис А.В. УЖЕ ПРОСМАТРИВАЕТСЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ БУДУЩЕЕ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ	10
<u>ПОЧВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОРЕМЕДИАЦИЯ</u> <u>ТЕХНОГЕННО-ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ</u>	
Абельгузин И.Р., Оразов О.Э., Рябцева Н.Д., Абдуллин М.И. ОЦЕНКА БИОТОКСИЧНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ НЕФТЕШЛАМОВ И НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ПОЧВОГРУНТОВ С ПОМОЩЬЮ РАСТЕНИЙ-ИНДИКАТОРОВ	15
Алтынчурин А.Х., Гирфанов А.Р., Рябцева Н.Д., Оразов О.Э. МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВОГРУНТОВ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И НЕФТЕШЛАМАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КОМПЛЕКСНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ	17
Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф., Киреева Н.А., Григориади А.С., Рафикова Г.Ф. ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА ASPERGILLUS В ЧЕРНОЗЕМАХ И ЛЕСНЫХ ПОЧВАХ БАШКОРТОСТАНА	19
Григориади А.С., Султанова Р.И. ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ-ФИТОРЕМЕДИАНТОВ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ПОЧВЫ СЫРОЙ НЕФТЬЮ	22
Дубовик И.Е., Шарипова М.Ю., Кабиров Т.Р. БИОИНДИКАЦИЯ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ВОДОРОСЛЕЙ	25
Ефремова В.А., Кондакова Л.В. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОЧВ Г. КИРОВА МЕТОДАМИ АЛЬГОИНДИКАЦИИ, ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И БИОТЕСТИРОВАНИЯ	29
Залилова Л.Р., Кеслер Н.А., Григориади А.С. УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ ТИПОВ ПОЧВ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН И КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ	33
Зимонина Н. М. АЛЬГОИНДИКАЦИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ РЕМЕДИАЦИОННЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ПОРОДНЫХ ОТВАЛОВ УГЛЕДОБЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В УСЛОВИЯХ КРАЙНЕГО СЕВЕРА	37
Кондакова Л.В., Домрачева Л.И. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЬГОФЛОРЫ ПОЧВ ФОНОВОЙ И ИСПЫТЫВАЮЩИХ ТЕХНОГЕННУЮ НАГРУЗКУ ТЕРРИТОРИЙ (НА ПРИМЕРЕ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ)	41
Мазанко М.С., Колесников С.И., Денисова Т.В. ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛА ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ СОЧЕТАННОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ НЕФТЬЮ И ПЕРЕМЕННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ ПРОМЫШЛЕННОЙ ЧАСТОТЫ	46

Налян А.Г., Ибрагимов Р.И., Ван Клей Д., Ван Клей А. ЗАВИСИМОСТЬ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЧВЕННЫХ ФАКТОРОВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДЕНАТУРИРУЮЩЕГО ГРАДИЕНТНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДНК ГЕНОВ 16S РРНК	49
Пирогова О.С. ВИДОВЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЧВЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ ДЕНДРОЛОГИЧЕСКОГО ПАРКА ЛЕСОВОДОВ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ	53
Турковская О.В. ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ОПТИМИЗАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ	56
Чугунова М.В., Бакина Л.Г., Капелькина Л.П., Герасимов А.О. ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ В ОСНОВНЫХ ТИПАХ ПОЧВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	57
Щемелинина Т.Н., Анчугова Е.М, Маркарова М.Ю., Мелехина Е.Н. ОЦЕНКА МЕТОДОВ РЕКУЛЬТИВАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ПО СВОДНЫМ ИНДЕКСАМ	61
<u>СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ</u>	
Архипова Т.Н., Кудоярова Г.Р., Мартыненко Е.В., Высоцкая Л.Б. ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНИНПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗАГУЩЕННЫХ ПОСЕВОВ РАСТЕНИЙ САЛАТА	66
Асатурова А.М., Жевнова Н.А, Томашевич Н.С., Хомяк А.И., Дубяга В.М., Павлова М.Д., Козицын А.Е. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ ОПЫТНЫХ ОБРАЗЦОВ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА	69
Ахметова А.Ш., Зарипова А.А. РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА <i>IRIS</i> L. В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	73
Аюпова Р.Н., Никитина В.С. ВЛИЯНИЕ РАЗНОГО УРОВНЯ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ В РАСТЕНИЯХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	77
Батькова И.А., Макарова Н.В. ФЛАВОНОИДЫ ВИНОГРАДА КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА	79
Батькова И.А., Макарова Н.В. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ КОСТОЧЕК ВИНОГРАДА С АНТИОКСИДАНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ: ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ	81
Батькова И.А., Макарова Н.В. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ СУШКИ НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ВИНОГРАДНЫХ ВЫЖИМОК	83

Валиахметова К.И., Марданшин И.С., Цветков В.О., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕТИЛЖАСМОНАТА НА АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА В ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ	86
Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. РОЛЬ ЭНДОФИТНОЙ БАКТЕРИИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 6Д И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ PR-БЕЛКОВ В ИНФИЦИРОВАННЫХ <i>SEPTORIA NODORUM</i> BERK. РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ	89
Газизова Г.Ч., Ситдикова Г.И., Зайцева К.П., Ямалеева А.А. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКТИНОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ БИОРЕГУЛЯТОРОВ И В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ОНТОГЕНЕЗА	95
Горностаева Е.А., Домрачева Л.И., Ковина А.Л., Трефилова Л.В. ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>FISCHERELLA MUSCICOLA</i> (THUR.) GOM.	98
Radik Zaynullin, Roberto Arredondo-Valdés, Anna Ilyina, Elda Patricia Segura-Ceniceros, José Luis Martínez-Hernández, Rayhana Kunakova EFFECT OF EXTRACTS FROM BIRCH TREE BARK, CHINA TEA AND THE ROOT OF CACTUS <i>Opuntia ficus-indicata</i> ON α -AMYLASE ACTIVITY	102
Зарипова А.А., Ахметова А.Ш., Мухаметвафина А.А. МОРФОГЕНЕЗ <i>DIGITALIS GRANDIFLORA</i> MILL. IN VITRO	106
Зарипова А.А., Ахметова А.Ш., Мухаметвафина А.А. РАЗМНОЖЕНИЕ <i>THERMOPSIS SCHISCHKINII</i> CZEFR. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO	110
Зарипова А.А. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ <i>POLYMONIUM CAERULEUM</i> L.	114
Зиновьев С.Г., Биндюг А.А. ВЛИЯНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГМ-СОИ В РАЦИОНАХ НА БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС КРОВИ И ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА СВИНЕЙ	118
Ильясова Е.Ю., Рафикова З.И., Григориади А.С. ИЗУЧЕНИЕ ОПОСРЕДОВАННОГО ВЛИЯНИЯ АНТИФУНГАЛЬНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РИЗОСФЕРЫ <i>BETA VULGARIS</i> В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ ФИТОПАТОГЕНОМ	123
Иргалина Р.Ш., Хайруллин Р.М. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ <i>B. SUBTILIS</i> В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ОТ ТВЕРДОЙ ГОЛОВНИ И КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ	127
Исаев Р.Ф., Иргалина Р.Ш. ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ И УРОЖАЙНОСТЬ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ	134
Коваль Е. В., Огородникова С. Ю. ВЛИЯНИЕ БИОПЛЕНОК <i>NOSTOC COMMUNE</i> НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОРНОЙ КИСЛОТОЙ	137

Кузьмина Л.Ю., Архипова Т.Н. КОЛОНИЗАЦИЯ КОРНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ ПШЕНИЦЫ ШТАММАМИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IB-21 и IB-22	141
Курамшина З. М., Смирнова Ю. В., Хайруллин Р. М. ВЛИЯНИЕ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ РАСТЕНИЙ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> ПРИ Cd-СТРЕССЕ	144
Малаева Е.В., Молканова О.И., Коновалова Л.Н. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>IN VITRO</i> МАЛОРАСПРОСТРАНЕННЫХ ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР	148
Максимов И.В., Нафикова А.Р., Сорокань А.В., Благова Д.К., Беньковская Г.В. ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ <i>Bacillus subtilis</i> 6Д СНИЖАЮТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА НА РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПУТЕМ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МИКРОФЛОРУ ЕГО ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ	152
Матистов Н.В., Ширшова Т.И., Бешлей И.В. ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНАТА НАТРИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СЕМЯН, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ <i>ALLIUM SCHOENOPRASUM</i> L.	155
Мухаметвафина А.А., Зарипова А.А. НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ РАЗМНОЖЕНИЯ И ОНТОГЕНЕЗ <i>BELAMCANDA CHINENSIS</i> (L.) DC. В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	158
Николаева В. В. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ (<i>Betula pendula</i> Roth), ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В ГОРОДЕ УФА (РЕСПУБЛИКА БАШКОРТОСТАН) ПО СРОКАМ НАСТУПЛЕНИЯ ЕЁ ФЕНОЛОГИЧЕСКИХ ФАЗ	162
Нужная Т.В., Веселова С.В., Максимов И.В. ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭТИЛЕНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К <i>SEPTORIA NODORUM</i> BERK.	164
Пыкало С.В., Зинченко М.А., Волощук С.И., Дубровная О.В. ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ КАЛЛУСА ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО	170
Рахматуллина С.Р., Еникеев А.Р. ВЛИЯНИЕ НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L. ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЦИНКА	174
Сафронова Г. В., Мельникова Н. В., Алещенкова З. М., Есенбаева А.Е., Тен О.А. АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ И ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИЕ РИЗОСФЕРНЫЕ БАКТЕРИИ ЯЧМЕНЯ И ПШЕНИЦЫ	178
Сергеев В.С., Дмитриев А.М. БИОПРЕПАРАТЫ И БИОАКТИВИРОВАННЫЕ УДОБРЕНИЯ НА ПОСЕВАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ	182
Сорокань А.В., Веселова С.В., Максимов И.В. ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ФИТОФТОРОЗУ	186

Фархутдинов Р.Г., Шелехов Д.В., Шафикова В.М., Прядко А.Н., Тукумбетова Г.Г. ВЛИЯНИЕ ФИТОПРЕПАРАТА НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА КАТАЛАЗЫ И ПЕЙЗАЖА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ У МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ APIS MELLIFERA MELLIFERA L. В ПЕРИОД ИХ ЗИМОВКИ.	189
Федяев В.В., Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Фархутдинов Р.Г., Веселов С.Ю. ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ ПРИ ДЕФИЦИТЕ ВОДЫ И ФОСФОРА	192
Цветков В.О., Ибрагимов Р.И., Шпирная И.А., Марданшин И.С., Валиахметова К.И., Яруллина Л.Г. ПРОТЕИНАЗЫ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА И ИХ ИНГИБИТОРЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ ПАСЛЕНОВЫХ РАСТЕНИЙ	195
Широков А.В., Ласточкина О.В., Юлдашев Р.А., Пусенкова Л.И. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ BACILLUS SUBTILIS В КОМПЛЕКСЕ С САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО РИЗОСФЕРЫ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ	199
Яруллина Л. М., Умаров И.А., Исаев Р.Ф., Новоселова Е.И., Ибрагимов Р.И. ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА ЗАЩИТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ФИТОФТОРОЗУ	202
Яруллина Л.Г., Касимова Р.И., Ахатова А.Р., Ибрагимов Р.И. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ХИТОЛИГОСАХАРИДАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ	205
Ямалеева А.А., Давлетбаев И.М., Ситдикова Г.И., Набеева Р.А., Ямалеев А.М. БИОДУСЛЕКТ – БИОЛОГИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ПРИ ФИТОПАТОГЕНЕЗЕ	209

УДК 631

НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ. ВКЛАД ПРОФЕССОРА Н.А. КИРЕЕВОЙ В ИЗУЧЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Новоселова Е.И.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Интенсивная добыча, транспортировка и переработка нефти с середины XX столетия привела к загрязнению и отчуждению из сельскохозяйственного пользования больших площадей почв. Проблема восстановления загрязненных территорий решалась учеными с использованием разных подходов. Исследования проводились во многих регионах нашей страны на почвах, сформированных в различных климатических условиях, на экспериментальных площадках с искусственным и «естественным» загрязнением, в лабораторных условиях. Изучалось влияние нефти и нефтяных углеводородов на физические, физико-химические, биологические свойства почв, разрабатывались подходы и приемы по рекультивации загрязненных территорий. Особое внимание уделялось изучению вопроса по деградации нефтяных углеводородов как аборигенной микрофлорой, так и с использованием биопрепаратов, созданных на основе углеводородоксиляющих микроорганизмов. Это направление с конца девяностых годов XX столетия стало одним из перспективных в рекультивации нефтезагрязненных земель. Данному вопросу и были посвящены исследования, проводимые Киреевой Н.А. и ее учениками.

Киреева Наиля Ахняфовна родилась 10 ноября 1948 года в г. Уфа Башкирской АССР в семье знаменитого башкирского писателя, ученого-фольклориста Кирея Мэргэна и известного в Уфе детского врача Магафиры Киреевой. В 1966 году, после окончания с золотой медалью школы, она поступила на биологический факультет Башгосуниверситета. По окончании университета в 1971 году Наиля Ахняфовна начала свою научную деятельность в лаборатории почвоведения Института биологии Башкирского филиала АН СССР. Появились первые научные публикации по ферментативному превращению азотсодержащих органических соединений в почве. С 1972 года ее научная деятельность была связана с Казанским государственным университетом, где она обучалась в аспирантуре. С этого момента и до последних дней жизни сфера ее научных интересов была связана с микробиологией. Завершив обучение в аспирантуре, Наиля Ахняфовна в 1977 году успешно защитила кандидатскую диссертацию на тему: «Природные ингибиторы нуклеазы *Serratia marcescens*». Свою трудовую деятельность она продолжила с 1978 года в Башкирском государственном университете, где до последних лет своей жизни работала на кафедре биохимии (впоследствии кафедра биохимии и биотехнологии). С начала 80-х годов XX столетия Наиля Ахняфовна активно начала заниматься вопросами нефтяного загрязнения почв: влиянием нефти, нефтяных углеводородов на их биологическую активность и вопросами рекультивации. Это научное направление было малоизученным. Результатом этой работы стала защита в 1996 году докторской диссертации «Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах» в Санкт-Петербургском технологическом университете.

После успешной защиты диссертации Наиля Ахняфовна продолжила активно работать в направлении изучения влияния нефти и нефтяных углеводородов на почвенные микроорганизмы, ферменты, биоремедиации нефтезагрязненных земель, активно сотрудничала с научными работниками Института биологии УНЦ РАН. Она под-

держивала научные связи со многими российскими и зарубежными учеными. В начале двухтысячных годов ею создана научная школа «Микробиологические методы восстановления техногенно-нарушенных земель». В этот период вместе с учениками она активно начала испытывать в Республике Башкортостан биопрепараты для восстановления нефтезагрязненных почв и водоемов. Первые исследования в этом направлении были проведены ею в конце девяностых годов. С 2004 года и до последних лет жизни их изучению уделялось большое внимание. Исследованы такие биопрепараты как Бел-витамил, Ленойл, Азолен, Универсал, Метаболит и др. Апробированы методы стимуляции аборигенной микробиоты для интенсификации биодеструкции нефтяных углеводородов, фиторемедиации в условиях Республики Башкортостан и показана их эффективность. Большой заслугой Наили Ахняфовны является серия работ по изучению влияния нефти и нефтяных углеводородов на активность почвенных ферментов. Исследован большой спектр почвенных ферментов, в том числе и мало изученных. Выявлены наиболее токсичные компоненты нефти для микроорганизмов и почвенных энзимов. Проведенные многочисленные эксперименты на нефтезагрязненных и рекультивируемых почвах во многих районах Республики Башкортостан, лабораторные исследования позволили ей и ее ученикам выделить и рекомендовать в практику биоиндикаторы загрязнения и мониторинга восстановления нефтезагрязненных почв.

Область ее научных интересов была обширна. Она охватывала вопросы по экологической биотехнологии, микробной деградации чужеродных соединений, почвенной микологии, микробно-растительным взаимоотношениям в антропогенных экосистемах. Под ее руководством защищено 3 докторских, 15 кандидатских диссертаций. Наила Ахняфовна стала крупным авторитетным специалистом, признанным как отечественными, так и зарубежными учеными в области почвенной микробиологии, энзимологии, экологической биотехнологии, биоремедиациитехногенно - нарушенных почв. Она является автором 729 работ, в том числе 6 монографий и 37 научно-методических публикаций, из которых 10 учебных пособий, 2 патентов РФ. Ею опубликовано 153 статьи в таких ведущих Российских научных журналах как «Почвоведение», «Микробиология», «Агрохимия», «Биотехнология» и др., а также 41 публикация в зарубежной печати. Наила Ахняфовна была членом специализированных Советов по защите докторских диссертаций при БашГУ, БГМУ и Институте биологии УНЦ РАН. Память о Киреевой Наиле Ахняфовне навсегда сохранится в наших сердцах.

УДК 602

УЖЕ ПРОСМАТРИВАЕТСЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ БУДУЩЕЕ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ

Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия

Такое странное на первый взгляд название доклада на самом деле вполне оправданно, как станет ясно, надо надеяться, из дальнейшего изложения. Но прежде чем перейти к объяснению – почему уже можно так говорить, стоит коротко задержать внимание читателей на том какой же смысл здесь вкладывается в понятие современной биологии. Она же вроде и так вся современна. Однако, за последние десятилетия, благодаря технологическим достижениям молекулярной биологии и накопленным этой наукой знаниям, произошли серьезные методические прорывы во многих областях биологии, работающие в которых специалисты ранее и не помышляли о новом для себя молекулярном уровне исследований. И биология, называемая здесь современной, рассматривается именно в этом контексте. Например, теперь вопросы установления филогенетического родства разных организмов часто решаются путем секвенирования различных генов и сопоставления их последовательностей, причем этот процесс будет только шириться. Но обо всем по порядку.

В первое десятилетие использования и развития методов секвенирования ДНК определение нуклеотидных последовательностей с 1977 по 1986 гг. велось ручными способами с помощью радиоактивной метки и при обязательном наличии рекомбинантных молекул ДНК, что позволяло заниматься этим процессом только молекулярно-биологическим лабораториям, располагающим соответствующим оборудованием, которое, впрочем, можно было изготовить тогда даже кустарным способом. При этом производительность секвенирования была довольно низкой. С появлением флуоресцентной метки и автоматизации ряда процессов производительность секвенирования выросла весьма значительно. Как возросла и стоимость уже довольно сложного оборудования в виде автоматических ДНК-секвенаторов. Весьма важным моментом для расширения «армии секвенаторщиков» стало появление в тот период метода ПЦР - полимеразной цепной реакции. Амплификация фрагментов ДНК с помощью ПЦР, позволяющая наработать нужные участки ДНК в количестве достаточном для секвенирования, по существу заменила собой молекулярное клонирование. Благодаря этому рядовое секвенирование по методу Сэнгера (т.е. секвенирование относительно небольших фрагментов ДНК) в таких приборах могли вести обзаведшиеся подобным оборудованием практически любые лаборатории, поскольку в продаже появились специальные готовые наборы для секвенирования. Однако выполнение крупных проектов в виде секвенирования полных геномов каких-либо свободноживущих организмов с помощью метода Сэнгера требовало не одного-двух, а десятков и даже сотен таких приборов и заметно больших усилий, на что оказались способны только все те же молекулярные биологи, работающие в крупных специализированных центрах, лабораторные помещения которых напоминали больше заводские цеха со стоящими в ряд многочисленными автоматическими ДНК-секвенаторами. Потребовалось соответствующее компьютерное и программное обеспечение вместе с подготовленными специалистами - биоинформатиками. Появились также новые услуги в виде заказного секвенирования разного масштаба - от фрагментов ДНК до полных геномов. (Желающие более подробно

ознакомиться с методами секвенирования ДНК в период с 1975 по 1998 гг. могут найти необходимую информацию в книге «Секвенирование ДНК» - А.В.Чемерис, Э.Д.Ахунов, В.А.Вахитов – М., «Наука», 1999 г., 429 С., в виде pdf-версии доступной на web-странице нашего института – <http://ibg.anrb.ru/monographs.html>.)

Дальнейшее развитие техники определения нуклеотидных последовательностей в виде разработки методов полногеномного секвенирования новых поколений повлекло за собой необходимость разработки и производства еще более дорогостоящих приборов, приобрести которые оказалось не всем «по карману». К тому же экспериментаторам пришлось учитывать масштаб стоящих перед ними задач, поскольку дешевле и проще стало секвенировать отдельные геномы на стороне «под заказ», нежели иметь у себя часто или подолгу простаивающее дорогостоящее оборудование. Более того, секвенирование на приборах новых поколений потребовало новых знаний и определенных навыков, позволяющих эксплуатировать такое оборудование лишь высококлассным специалистам – опять-таки только молекулярным биологам. Отдельной задачей стала сборка геномов секвенируемых организмов из огромного множества так называемых ридов (коротких черновых последовательностей), объединяемых в более протяженные контиги в виде перекрывающихся последовательностей ридов. Несмотря на то, что эту работу выполняет компьютер, очень важное значение имеет какого типа секвенирование было проведено - ресеквенирование или секвенирование *de novo*. В последнем случае задача усложняется даже не на порядок, равно как и стоимость такого проекта.

Таким образом, оборудование для «нового» секвенирования стало концентрироваться в крупных специализированных центрах, как в ранее действующих при эксплуатации метода Сэнгера, так и в новых. Ситуация несколько поменялась после появления на рынке относительно недорогих полногеномных секвенаторов полупроводникового типа. Что касается будущего полногеномного секвенирования, то при сохранении и, особенно при развитии нынешней тенденции некоторого упрощения методов и технологий, приборами четвертого и пятого поколений, скорее всего, смогут овладеть профессионалы уже не столь высокого уровня, который требуется сейчас и тогда их опять смогут применять представители других биологических дисциплин, как ранее произошло в результате разработки ПЦР-секвенирования по Сэнгеру.

Как уже упоминалось выше существует просто гигантская разница между ресеквенированием и секвенированием *de novo* полных геномов, однако со временем будет все больше ресеквенирования, поскольку многие геномы часто исследуемых видов, а также близкородственные им будут уже многократно секвенированы, и фактически, имея базовые референсные последовательности геномов многих организмов, в них необходимо будет лишь определять полиморфные участки. Таким образом, и биоинформатическая составляющая процесса полногеномного секвенирования будет несколько упрощаться, сопровождаемая к тому же усилением мощности компьютерной техники и совершенствованием программного обеспечения. Все это может привести к тому, что секвенировать геномы свободноживущих организмов (по крайней мере, ресеквенировать) смогут опять-таки практически любые лаборатории, которые будут в состоянии позволить себе приобрести полногеномные секвенаторы будущих поколений и покупать расходные материалы к ним, тем более, что себестоимость ресеквенирования генома человека с помощью технологии, например, пятого поколения не должна превышать ста долларов. Сейчас на это требуется около шести тысяч.

Что же произойдет на поле биологических наук после появления новых технологий секвенирования ДНК четвертого и пятого поколений? Ни одна технология не сможет оказать столь сильное влияние на всю биологическую науку как высокопроизво-

длительное полногеномное секвенирование новых поколений. Полностью потеряют свою актуальность такие трудоемкие методы, как вычитающая гибридизация, блот-гибридизация. Цифровая ПЦР станет востребованной лишь в некоторых диагностических случаях. Выявление полиморфизма ДНК, основанное ныне на амплификации отдельных участков генома с помощью ПЦР или иных способов, включая чиповые технологии, станет бессмысленной тратой времени и денег, поскольку определять нуклеотидные последовательности сразу всего генома любых организмов даже *de novo* станет куда дешевле, проще, удобнее и быстрее. Не говоря уже о ресеквенировании. Поэтому полиморфизм ДНК будет выявляться с помощью биоинформатики путем сравнения геномов целиком или соответствующих участков геномных последовательностей, где с точностью до нуклеотида будут обнаруживаться различия между особями, штаммами, видами, родами, представителями других таксономических единиц. Таким образом, сильный импульс получит систематика организмов, которая благодаря полногеномному секвенированию сможет приблизиться к воссозданию истинной картины взаимосвязи на Планете всего живого. Новый вид бактерий будет приниматься за новый только после установления всей последовательности генома.

Какое же все-таки оно будет полногеномное секвенирование четвертого, пятого и возможно последующих поколений? Все же более перспективными представляются методы мономолекулярного секвенирования, пока уступающие технологиям, рассчитанным на массивный параллелизм. Последние требуют очень непростой пробоподготовки, занимающей довольно много времени и состоящей из многих стадий (фрагментация, фракционирование, пришивка адапторов, амплификация, обогащение и др.), к тому же есть риск сделать что-то не так на каждой из них. По сравнению с мономолекулярными, требуется большее количество исходной ДНК, что бывает не всегда доступно, особенно при работе с древними организмами. При этом амплификация на стадии пробоподготовки может приводить к ошибкам при прочтении последовательности нуклеотидов из-за сбоев ДНК-полимеразы. Этап амплификации вообще может не привести к наработке нужной матрицы в силу того, что в цепочке ДНК, поврежденной временем (либо недавними физическими или химическими воздействиями), могут быть места, лишенные азотистых оснований, на которых ДНК-полимераза не просто «споткнется», а остановится, хотя в таких случаях уже предлагается использовать спектр репарирующих ферментов, но и они не всеильны. Что касается секвенирования таких поврежденных молекул ДНК мономолекулярным методом в том числе с использованием ДНК-полимеразы, то данный фермент, пусть и не пройдет это место (без репарации или даже после оной), но даст возможность прочесть последовательность хотя бы до него. Причем, нельзя исключать, что в будущем может появиться метод мономолекулярного секвенирования, в котором вовсе не будет этапа ферментативного построения новой цепи. При использовании такого метода, даже при отсутствии отдельных азотистых оснований будут читаться участки, как до такого места, так и после него. Потенциально мономолекулярные методы могут позволить читать весьма протяженные участки до нескольких тысяч, десятков тысяч и даже сотен тысяч оснований, чего принципиально невозможно достичь методами массивного параллелизма. Еще одним важным моментом является относительно легкая масштабируемость таких методов, которая позволит тратить расходных материалов каждый раз столько, сколько нужно для выполнения небольшого проекта по секвенированию, даже, если сам прибор за один запуск принципиально будет позволять «читать» многие терабазы. Огромным преимуществом мономолекулярных методов станет возможность непосредственно выявлять модифицированные основания (например, метилцитозин) безо всяких нежелательных химических обработок (которые всегда заставляют думать об их пол-

ноте, точнее сомневаться в ней). Наиболее удобным методом мономолекулярного секвенирования ДНК четвертого/пятого поколений будет тот, который позволит секвенировать и весь пул молекул РНК в любой клетке без их перевода в кДНК, что крайне важно при изучении полных транскриптомов, что в свою очередь позволит перейти на совершенно новый уровень диагностики, поскольку даст возможность оценивать функциональное состояние отдельных органов и тканей организма, включая даже человека.

Несмотря на то, что станут известными полногеномные последовательности большого числа организмов, эта информация в виде «буковок»-нуклеотидов в базах данных никак не сможет заменить какой-нибудь ген, который физически может оказаться «в руках» экспериментатора только в результате процедур мономолекулярного клонирования. При этом за счет накопленной к тому времени информации о генах и геномах создание рекомбинантных молекул ДНК и на их основе генно-инженерных штаммов микроорганизмов, генетически модифицированных животных, трансгенных и трансплазмидных растений, а также неких новых организмов будет вестись более осознанно и с увеличенной эффективностью.

Вопросы технологического будущего современной биологии подробно рассмотрены нами в опубликованной в нескольких номерах подряд в издаваемом нашим институтом электронном рецензируемом журнале «Биомика» (<http://biomics.ru>) статье «Некоторое технологическое прошлое, настоящее, а также будущее современной биологии к 2030 году».

**ПОЧВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОРЕМЕДИАЦИЯ ТЕХНОГЕННО-
ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ**

УДК 593.11:665.61

**ОЦЕНКА БИОТОКСИЧНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ НЕФТЕШЛАМОВ
И НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ПОЧВОГРУНТОВ
С ПОМОЩЬЮ РАСТЕНИЙ-ИНДИКАТОРОВ**

Абельгузин И.Р., Оразов О.Э., Рябцева Н.Д., Абдуллин М.И.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Нефть представляет собой сложную смесь жидких органических веществ, в которых растворены различные твердые углеводороды и смолистые вещества. Нефти различных месторождений значительно различаются по фракционному и химическому составу. Высокие концентрации компонентов нефти в почвах всегда угнетают жизнедеятельность растений. При этом воздействие в существенной мере зависит от химической природы углеводородов [1, 2].

Целью данного исследования было изучение степени токсичности фракций нефтепродуктов, полученных разделением нефтешламов с территории ОАО «Газпромнефтехим-Салават» с помощью фитотестов.

Для опыта отбирали пробу почв, загрязнённую в лабораторных условиях. Для этого в каждую кювету поместили почвогрунт универсальный массой 200 г. В кюветах №1 – №7 равномерно распылили на каждого по 5 мл полученную фракцию при перегонке. Для оценки степени токсичности в качестве тест-культур были использованы семена кресс-салата и редиса. Проводили опыт в течение 3-4 дней. Затем оценивали всхожесть семян тест-культур.

Разгонкой нефтешламов на лабораторной установке было получено семь фракций (табл.1).

Таблица 1.
Состав групп соединений нефтешламов с территории ОАО «Газпром нефтехим Салават»

№ п/п	Состав	T _{кип} , °C	Выход, мл
I	Парафины и циклопарафины	100 - 110	8
II	Циклопарафины и летучие ароматические	155 - 160	25
III	Тяжелые парафины и ароматика	177 - 180	13
IV	Дициклические	193 - 200	23
V	Нафтеноароматические углеводороды	206 - 220	19
VI	Полициклические	229 - 240	16
VII	Смесь тяжелых углеводородов	250 - 260	6

Наиболее быстрым и информативным является фитотест на чувствительных растениях. Данные тестирования приведены в таб. 2 и 3. По сравнению с контролем, наименьшая токсичность как для кресс-салата, так и для редиса была фракция № IV,

Всероссийская конференция «Биотехнология – от науки к практике»
ПОЧВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОРЕМЕДИАЦИЯ ТЕХНОГЕННО-ЗАГРЯЗНЕННЫХ
ТЕРРИТОРИЙ

которая практически не повлияла на всхожесть семян, однако существенно воздействовала на длину проростков. Максимальная токсичность выявлена у фракции №VII (смесь тяжелых углеводородов). Фракция № II (предположительно включавшая циклопарафины и летучие ароматические соединения) умеренно снижала всхожесть семян тест-объектов, но меньше других тормозила рост проростков. В целом, растения кресс-салата оказались более чувствительными к воздействию нефтепродуктов, хотя существенных межвидовых различий не выявлено.

Таблица 2.

Всхожесть семян растений, используемых в качестве тест-культур, в условиях загрязнения образцов почвы различными нефтепродуктами для редиса сорта «Французский завтрак»

Биотест-культуры	Образцы почв	Время, сутки					
		3 сутки		9 сутки		12 сутки	
		Всхожесть, %	Длина ростков, мм.	Всхожесть, %	Длина ростков, мм.	Всхожесть, %	Длина ростков, мм.
Редис «Французский завтрак»	I	0	0	0	1	80	21
	II	0	0	0	6	70	42
	III	0	0	0	4	80	20
	IV	0	0	10	13	100	28
	V	0	0	0	12	70	32
	VI	0	0	30	6	70	18
	VII	0	0	0	8	50	3
Контроль	0	0	0	60	20	100	52

Таблица 3.

Всхожесть семян растений, используемых в качестве тест-культур, в условиях загрязнения образцов почвы различными нефтепродуктами для кресс-салата.

Биотест-культуры	Образцы почв	Время, сутки					
		3 сутки		9 сутки		12 сутки	
		Всхожесть, %	Длина ростков, мм	Всхожесть, %	Длина ростков, мм	Всхожесть, %	Длина ростков, мм.
Кресс-салат	I	0	0	20	2	80	15
	II	0	0	10	1	70	23
	III	0	0	0	0	80	18
	IV	0	0	10	1	100	13
	V	0	0	0	0	70	8
	VI	0	0	30	6	70	12
	VII	0	0	0	0	50	3
Контроль		0	0	50	15	100	35

Таким образом, в опытах по определению токсичности фракций нефтешламов с помощью фитотестов установлено, что наиболее токсичной является смесь тяжелых углеводородов с температурой кипения 254-260 °С, 2,5% содержания которой в почвогрунтах приводило к 50%-ной потере всхожести семян и подавлению удлинения проростков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киреева Н.А. Влияние загрязнения почв нефтью на физиологические показатели растений и ризосферную микробиоту / Н.А. Киреева, Е.И. Новоселова, А.С. Григориади // *Агрехимия*. – 2009. -№7 – С. 71-79.
2. Зильберман М. В Биотестирование почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами / М. В. Зильберман, Е. А. Порошина, Е. В. Зырянова – Пермь: УралНИИ «Экология», 2005.- 110 с.

УДК 631.427

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВОГРУНТОВ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И НЕФТЕШЛАМАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КОМПЛЕКСНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Алтынчурин А.Х., Гирфанов А.Р., Рябцева Н.Д., Оразов О.Э.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Загрязнение природной среды нефтью и сопутствующими загрязнителями – острейшая экологическая проблема во многих регионах России. Химическое загрязнение почвенного покрова происходит практически на всех стадиях добычи, переработки и хранения нефти и нефтепродуктов. Последствия нефтяного загрязнения непредсказуемы, они зависят от количества и состава загрязняющих веществ. А от этого зависит, приспособится ли экосистема к новым условиям и начнет восстанавливать свои функциональные звенья, или перейдет от нестабильного состояния к полной деградации.

Естественное восстановление плодородия почв при комплексных загрязнениях нефтепродуктами и сопутствующими поллютантами происходит значительно дольше, чем при других техногенных загрязнениях, поэтому наиболее сильно обостряется проблема их сельскохозяйственного и других видов использования.

Целью данной работы было установление предельной нагрузки комплексного загрязнения на основе нефтепродуктов и тяжелых металлов на почвенные образцы по результатам фитотестирования.

Таблица 1.

Сводные данные по фитотестированию модельных композиций загрязнителей по опыту 2* (цифры I-V обозначают номер кюветы с соответствующим схеме набором токсикантов и внесением разрыхлителей)

Биотест-культуры	Образцы почв	Время вегетации									
		3 сутки		7 сутки		10 сутки		12 сутки		15 сутки	
		Всхожесть, %	Длина ростков, см	Всхожесть, %	Длина ростков, см	Всхожесть, %	Длина ростков, см	Всхожесть, %	Длина ростков, см	Всхожесть, %	Длина ростков, см
Редис	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	80	4	80	7	80	8	100	10
	IV	20	1	50	6	100	7,5	100	9	100	9,5
	V	30	1,5	50	4	80	7	90	9	90	11
Кресс-салат	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	50	1	90	2,5	100	5	100	5	100	5,5
	IV	50	0,5	90	3	90	4,5	90	5	90	5
	V	0	0	40	2	50	3,5	50	4	50	4

*Примечание. В качестве добавок к исходным почвогрунтам добавлено:

I-20г NaCl и 1 мл нефтешлама; II-20г NaCl , 1 мл нефтешлама и 20 г вермикулита; III-20г NaCl и 1 мл нефтешлама и 20 г опилок; IV-1 мл нефтешлама и 20г опилок; V-1 мл нефтешлама и 20г вермикулита.

Образцы почвогрунтов искусственно загрязняли тяжелыми и легкими фракциями нефтепродуктов. В качестве добавок для моделирования комплексного загрязнения вносили соли тяжелых металлов – $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, $\text{HgNO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и CuSO_4 . Кюветы равномерно увлажняли, внося через равные промежутки времени равные объемы дистиллированной воды. Инкубацию осуществляли в течение 30 суток при температуре 24 °С. Затем оценивали всхожесть семян тест-культур. Далее определяли экологически безопасную концентрацию комплексных загрязнений.

В табл. 1 приведены результаты по второму опыту, в котором смоделировано засоление среды наряду с загрязнением нефтешламами.

В кюветах с добавлением солей тяжелых металлов не происходит подавление всхожести семян обоих видов растений, а дальнейшее увеличение концентраций экотоксикантов оказывает фитотоксическое воздействие. Следовательно, приведенные значения следует считать пределом экологической нагрузки. Она составляет для смешанного загрязнителя значение 2,5 г/кг нефтешлама + 1,5 г/кг солей тяжелых металлов. Причем, как показали опыты, состав солей не влияет на токсичность, а важна лишь их суммарная концентрация.

Как видно из полученных результатов, при совместном воздействии экстремальных условий засоления и внесения нефтешламов, полностью подавляется жизнеспособность тест-объектов. Наличие вермикулита не снижает степень токсичности та-

ких повогрунтов (II), так как это не уменьшает воздействие поваренной соли. В то же время внесение древесных опилок существенно снижает фитотоксичность поваренной соли (III), по-видимому, за счет ее частичной сорбции. При отсутствии засоления среды, внесение структурообразователей обоих типов благоприятно сказывается на снижении токсичности почвогрунтов, загрязненных нефтешламами (IV и V). Таким образом, моделирование экстремального засоления почв (100 г/кг грунта) совместно с внесением нефтешламов (10 г/кг) показало лимитирующее влияние фактора засоления, на которое не оказывает влияние структурный состав почвы. Однако внесение в засоленные грунты 1/10 объемной части опилок лиственных пород существенно снижает фитотоксичность засоленных почв, содержащих нефтешламы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова Н.В., Шведова А.В. Влияние свинца и кадмия на фитотоксичность почвы // Экология и промышленность России. - 2005. - №4. – С. 32 – 35.
2. Оборин А.А. Нефтезагрязненные биогеоценозы (процессы образования, научные основы восстановления, медико-экологические проблемы): монография / А. А. Оборин. – Пермь, 2008. - 511 с.

УДК 631.466.1

ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА *ASPERGILLUS* В ЧЕРНОЗЕМАХ И ЛЕСНЫХ ПОЧВАХ БАШКОРТОСТАНА

Бакаева М.Д.¹, Галимзянова Н.Ф.¹, Киреева Н.А.², Григориади А.С.²,
Рафикова Г.Ф.¹

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН

²Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Последние десятилетия характеризуются возрастанием интереса к микроскопическим грибам рода *Aspergillus*: местам их обитания, экологии и физиологии. Это обусловлено способностью многих видов аспергиллов наносить серьезный ущерб продуктам питания за счет образования широкого спектра токсических веществ, повреждать различные конструкционные материалы. Кроме того, аспергиллы являются возбудителями инфекционных заболеваний человека [1-3].

Целью настоящей работы является обобщение данных по видовому составу и встречаемости микроскопических грибов рода *Aspergillus* в основных типах почв Башкортостана.

В течение 25 лет были проанализированы более 700 образцов почв различных типов, в том числе находящихся в сельскохозяйственном использовании и занятых нефтедобывающими предприятиями. Полевые опыты проводили в Уфимском, Кармаскалинском, Хайбуллинском районах республики Башкортостан. Кроме того, в работе приведены данные, полученные в лабораторных экспериментах по изучению влияния

загрязнения нефтью и нефтепродуктами на комплексы микроскопических грибов различных типов почв. Выделение микромицетов проводили общепринятыми методами. Для оценки значительности видов использовали показатели пространственной и временной встречаемости, а также относительное обилие вида. Идентификацию видов осуществляли на основании культурально-морфологических признаков. Названия видов даны в соответствии с современной номенклатурой (www.indexfungorum.org).

Из различных типов почв Башкортостана было выделено 18 видов аспергиллов. Типичными представителями микобиоты черноземов были виды *A. ustus*, *A. niger*, *A. wentii*, причем последние могли занимать доминирующее положение в комплексах [4-7]. Аналогичные данные были получены при изучении видового состава микромицетов выщелоченного чернозема Центральной черноземной зоны [8]. Отдельные виды аспергиллов были приурочены к конкретным подтипам чернозема. Виды *A. oryzae* и *A. restrictus* выделялись только из выщелоченного чернозема, *A. kanagawaensis* и *A. flavipes* - из типичного, а *A. versicolor* - из южного.

Состав аспергиллов серых лесных почв характеризовался наличием ряда видов, не встречавшихся в черноземах - *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. sydowii*.

Антропогенное воздействие на почву приводило к изменениям в видовом составе аспергиллов. Введение почвы в сельскохозяйственный оборот снижало количество выделяемых видов, что видно на примере чернозема южного (за счет выпадения видов *A. fumigatus* var. *albus* и *A. versicolor*).

Совершенствование систем земледелия в настоящее время связано с уменьшением механического воздействия на почву за счет внедрения технологий нулевой обработки, способствующих не только сохранению механической структуры почвы, но и пожнивных остатков, которые служат источником пополнения органического вещества почвы. Одним из перспективных способов ускорения гумификации растительных остатков является применение микроорганизмов-целлюлозолитиков, таких как грибы рода *Trichoderma*. Триходермы обладают не только мощным ферментативным аппаратом, но и способны продуцировать различные антибиотические вещества, что обусловило их достаточно широкое использование для защиты растений от фитопатогенных микромицетов [9]. Однако интродукция в почву таких мощных биологических агентов может повлиять на видовой состав микромицетов. В полевом опыте показано, что внесение в почву соломы совместно с *Trichoderma sp.* способствует сокращению обилия *A. niger* и *A. ochraceus*, но не приводит к значимым изменениям комплекса микроскопических грибов [10].

Нефтедобыча и нефтепереработка являются важными отраслями промышленности Башкортостана. Технологические процессы, связанные с этими отраслями не исключают возможности возникновения аварийных ситуаций, при которых в окружающую среду, в первую очередь в почву, попадают нефть и нефтепродукты. При загрязнении нефтью почвы увеличивалось количество выделяемых видов рода *Aspergillus*, что было показано как в полевых, так и лабораторных опытах [11,12]. Следует отметить, что в серых почвах эта особенность была выражена более отчетливо, чем в черноземах (с 5 до 9 видов в серой лесной почве и с 3 до 5 видов в темно-серой лесной почве). Увеличение разнообразия аспергиллов при загрязнении нефтью может быть связано с появлением устойчивых к углеводородам видов (*A. fumigatus*, *A. granulosis*, *A. repens*, *A. terreus*), которые, как правило, проявляют фитотоксические свойства, что и было показано для аспергиллов, выделенных из нефтезагрязненных серых почв [13].

Одним из опасных загрязнителей, сопутствующих нефтедобыче являются нефтепромысловые сточные воды (НСВ). НСВ представляют собой высокоминерализо-

ванные воды, содержащие различные, в том числе и высокотоксичные, вещества, что делает их поллютантом, обладающим высокой геохимической активностью [14]. В полевых исследованиях показано, что загрязнение почвы НСВ приводило к сокращению видов рода *Aspergillus* в черноземе типичном за счет исчезновения чувствительных видов - *A. kanagawaensis*, *A. ustus*, в лабораторном эксперименте в варианте с загрязнением НСВ был обнаружен *A. versicolor*, выделявшийся лишь из чернозема южного.

Современным способом очистки почв от нефтяных загрязнений является биоремедиация, основанная на использовании биопрепаратов, состоящих из активных углеводородоокисляющих бактерий. Одним из перспективных направлений развития технологий биорекультивации почв может рассматриваться полифункциональное биодополнение. При использовании этого подхода в очищаемый субстрат вносят не только микроорганизмы, разрушающие загрязнитель, но и микроорганизмы, способствующие восстановлению основных функций нарушенного микробиоценоза [15]. Интродукция в загрязненную почву организмов, не свойственных биотопу, может изменять состав и структуру комплекса микроскопических грибов. Так, применение биопрепарата «Елена», на основе антагониста фитопатогенных грибов *Pseudomonas aureofaciens*, для коррекции микробиоценоза нефтезагрязненных почв приводило к уменьшению встречаемости *A.fumigatus* и *A. niger* [16, 17].

Таким образом, род *Aspergillus* в изученных почвах Башкортостана представлен 18 видами, большинство из которых являются редкими. Типичным видом для черноземов служит *A. wentii*, а для серых лесных почв – *A. niger*. Антропогенные факторы способны оказывать влияние на обилие, разнообразие и встречаемость аспергиллов, что следует учитывать в процессе мониторинга потенциально опасных почвенных микробиоценозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson D. M, Mubatanhema W., Jurjevic Z. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns// *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2002.504. P.3-17.
2. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М.: Мир, 2001. 486 с.
3. Mc Cormick A., Loeffler J., Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen// *Cell Microbiology*. 2010. 12(11). P.1535-1543.
4. Галимзянова Н.Ф., Андресон Р.К. Регулирование видового состава и содержания мицелия почвенных микромицетов с помощью агротехнических приемов как аспект почвенной биотехнологии// *Актуальные вопросы биотехнологии*. Уфа. 1990. С.14-21.
5. Галимзянова Н.Ф., Андресон Р.К. Комплексы микромицетов выщелоченного чернозема в агроценозе // *Почвоведение*. 1992. № 7. С.134-138.
6. Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. Микромицеты чернозема южного при использовании нетрадиционных видов органических удобрений// *Известия Самарского научного центра РАН*. 2011. Т.13. № 5(3). С.30-32.
7. Киреева Н.А, Галимзянова Н.Ф. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов // *Почвоведение*. 1995. №2. С. 211-216.
8. Свистова И.Д. Микромицеты чернозема – продуценты целлюлолитических ферментов. Воронеж: Изд-во гос. ун-та. 2003.- 152 с.
9. Harman G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. // *Phytopathology*. 2006. Vol. 96. №. 2. P. 191-194.

10. Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. Оценка влияния интродукции грибов рода *Trichoderma* на комплекс микромицетов при традиционной и нулевой обработке почвы// Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т.15. № 3(4). С.1246-1249.
11. Киреева Н.А Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф. Влияние возрастающих концентраций нефти на микромицеты в выщелоченном черноземе // Микология и фитопатология. 2003. Т. 3. вып. 2. С. 53-59.
12. Киреева Н.А Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф. Влияние загрязнения почвы нефтью на структуру комплекса микромицетов в прикорневой зоне люцерны//Микология и фитопатология. 2005.Т.39, вып.2. С.49-55.
13. Киреева Н.А., Галимзянова Н.Ф., Мифтахова А.М. Микромицеты почв, загрязненных нефтью, и их фитотоксичность //Микология и фитопатология. 2000. Т.34. №1. С.36-41.
14. Габбасова И.М. Деградация и рекультивация почв Башкортостана. Уфа: Гилем, 2004. 284 с.
15. Логинов О.Н., Силищев Н.Н, Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Биорекультивация:микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов. М.: Наука, 2009. 112 с.
16. Киреева Н.А Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф. Изменение видового разнообразия микромицетов нефтезагрязненных почв при биоремедиации// Микология и фитопатология. 2006.Т.40. вып.1. С.47-52.
17. Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф., Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н., Григориади А.С., Якупова А.Б. Влияние биофунгицида Елена на комплексы микромицетов нефтезагрязненных почв различных типов при биоремедиации// Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. вып.1 . С.53-62.

УДК 581.132.1

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ- ФИТОРЕМЕДИАНТОВ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ПОЧВЫ СЫРОЙ НЕФТЬЮ

Григориади А.С., Султанова Р.И.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Проблемы загрязнения почвы различными поллютантами в настоящее время носит глобальный характер. В настоящее время разработано множество методов ее реабилитации и очистки. Среди способов биологической ремедиации широкое распространение получила фитомелиорация. Как любой подход к восстановлению нарушенных земель имеет свои ограничения. Растения способны выживать и давать необходимую биомассу и степень проективного покрытия лишь при относительно невысокой концентрации загрязнителя в почве. Полностью устойчивых к загрязнению видов растений нет. Можно говорить лишь о некотором пороге чувствительности растений к определенным концентрациям поллютанта [1,2]. Поиски видов-фиторемедиантов

удобно проводить среди дикорастущих растений, случайно оказавшихся в зоне влияния того или иного загрязнителя.

В предыдущих исследованиях уже была доказана устойчивость дягиля лекарственного к действию нефтяного загрязнения и обосновано его использования в качестве фиторемедианта нефтезагрязненных земель [3]. Однако поиски этим вариантом не ограничились. Было сделано предположение, что лопух большой *Arctium majus* Berh, как и дягиль, являющийся широко встречающимся видом и средних районах европейской части России, а также способный накапливать большую биомассу, тем самым увеличивая возможность утилизации поллютантов путем фитоэкстракции, может обладать схожими способностями в отношении восстановления нефтезагрязненной почвы. К тому же, лопух большой является рудеральным растением, что характеризует его как растение устойчивое к антропогенному влиянию.

Учитывая вышеизложенное, целью данной работы явилось изучение и сравнение устойчивости дикорастущих видов *Arctium majus* и *Archangelica officinalis* к загрязнению почвы нефтью.

Модельный эксперимент был проведен на образцах серой лесной почвы. В качестве растений фиторемедиантов использовали дягиль лекарственный (*Archangelica officinalis*) и лопух большой (*Arctium majus*). Опытные растения вместе с комом почвы пересаживали в отдельные вегетационные сосуды, заливали сырой нефтью в концентрациях 1 и 6% от массы почвы. В качестве контроля использовали растения, произрастающие на незагрязненной почве. Исследования проводили через 30 и 60 сут. Влияние нефтяного загрязнения на растения оценивали по содержанию пигментов в листьях [4].

Одним из важнейших эколого-физиологических параметров оценки влияния нефтяного загрязнения на рост и развитие растений являются изменения в фотосинтетическом аппарате, в частности содержание хлорофилла в листьях растения.

Как известно, хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода детектором состояния клеток растений. Фотосистема II является индикатором и мишенью при воздействии таких внешних факторов, как экстремальные температуры, избыточная освещенность, соли тяжелых металлов, высушивание, повышение содержания солей в питательной среде [5].

Через 30 сут. были отмечены дозозависимые изменения фотосинтетического аппарата *A. officinalis*, проявлявшиеся в активизации синтеза хлорофиллов при загрязнении почвы. Максимальный показатель достигалось после внесения в почву нефти в концентрации 1% (рис. 1). Спустя 60 сут. культивирования растений на нефтезагрязненной почве отмечено угнетение фотосинтеза, проявившееся в снижении содержания хлорофилла *a* в листьях растений. Однако изменений в концентрации хлорофилла *b*, более устойчивого к действию стрессоров, по сравнению с предыдущими исследованиями данного показателя в условиях загрязнения.

Отсутствие изменений в отношении хлорофиллов *a* и *b* указывает на одинаковый с контролем характер распределения хлорофилла между отдельными хлорофилл-содержащими комплексами.

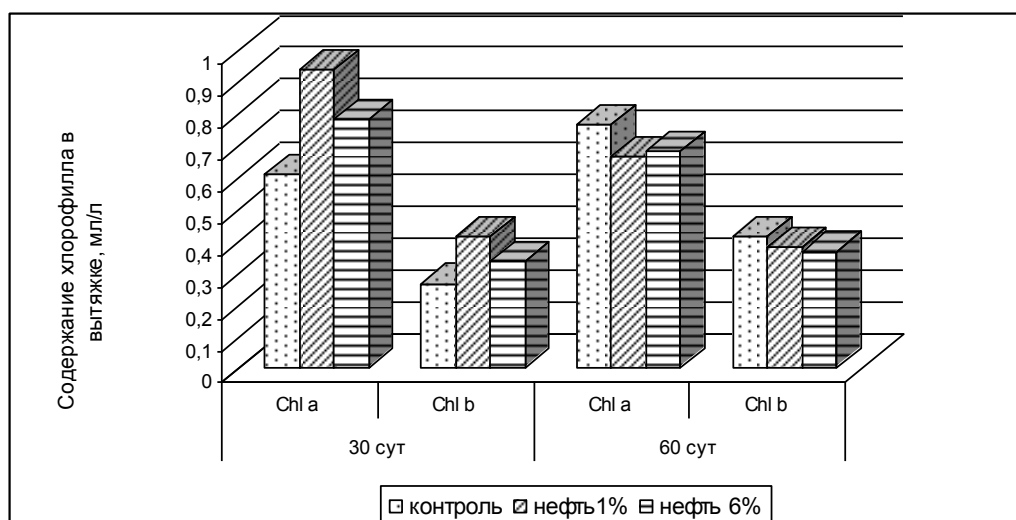


Рис. 1. Изменения содержания хлорофилла *a* и *b* в листьях *Archangelica officinalis* на 30 и 60 сутки после внесения нефти.

Результаты спектрофотометрических исследований и последующих расчетов показали, что внесение нефти не оказала влияния на содержание хлорофилла *a* в растениях лопуха (рис.2). В ходе проведения эксперимента обнаруживалось визуальное угнетение развитие роста в первые сутки, после внесения загрязнителя в почву, однако спустя месяц растения адаптировались и продолжили вегетировать, что подтверждает проведенное биохимическое исследование.

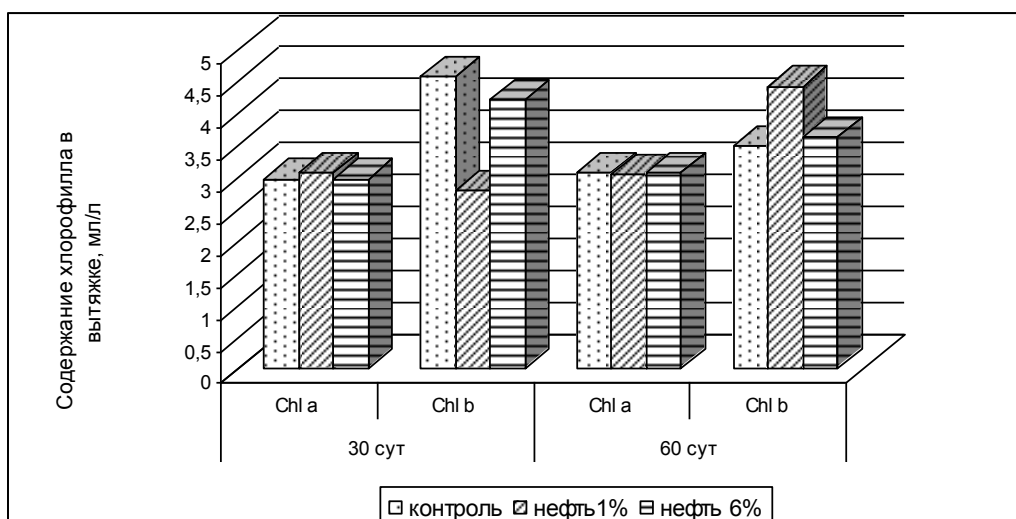


Рис. 2. Изменения содержания хлорофилла *a* и *b* в листьях *Arctium majus* через 30 и 60 сутки после внесения нефти.

К присутствию в почве нефтяных углеводородов, оказывающих влияние на рост и развитие растений, чувствительным оказался показатель содержания хлорофилла *b* при малых дозах загрязнения. Как видно на рисунке 2, спустя 30 суток после начала опыта показатель снизился на 61% по сравнению с контрольными образцами, но уже через 60 суток содержание пигмента возросло в 1,6 раз. Это отразилось и на отношении пигментов друг к другу.

Таким образом, в течение 60 суточного эксперимента фотосинтетический аппарат обоих растений проявил устойчивость и изменения в содержании пигментов в листьях не достигало критических значений, представляющих угрозу дальнейшего развития растений. Фотосинтетический аппарат *Arctium majus* проявил высокую толерантность к действию нефти, что позволяет проводить дальнейшие исследования этого растения в качестве активного фиторемедианта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киреева, Н.А. Мониторинг растений, используемых для фиторемедиации нефтезагрязненных почв / Н.А. Киреева, В.В. Водопьянов // Экология и промышленность России. – 2007. – сентябрь. – С. 46-47.
2. Чижов, Б.Е. Растения-мелиоранты для рекультивации нефтезагрязненных почв / Б.Е. Чижов, А.И. Захарова, А.М. Шишкин // Леса и лесное хозяйство Западной Сибири. Вып.7. – Тюмень: Изд-во Тюменского государственного университета, 2006. – С. 221-229.
3. Баширова Р.М., Григориади А.С., Киреева Н.А., Борисова Н.С., Зимин Ю.С. Устойчивость дягиля лекарственного к загрязнению почвы сырой нефтью // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 5. С. 710-715
4. Jeffrey S.W., Humphrey G.R. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanzen Bd. 1975. V. 167. P. 191-194.
5. Pätsikkä, E. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by out-competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll. / E. Pätsikkä, M. Kairavuo, F. Sersen, E.-M. Aro, E. Tuystjärvi // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129. – P. 1359-1367.

УДК 582.26

БИОИНДИКАЦИЯ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ВОДОРОСЛЕЙ

Дубовик И. Е.¹ Шарипова М. Ю.¹, Кабиров Т.Р.²

¹Башкирский государственный университет

²Башкирский государственный педагогический университет, г. Уфа, Россия

В современном обществе, зависящем от углеводородных энергоресурсов, одним из наиболее масштабных техногенных загрязнителей является нефть. Попадая в почву, нефть оказывает как прямое, так и опосредованное влияние на биологическую активность почв. Цианобактерии и водоросли, являясь постоянным компонентом почвенной биоты и испытывая антропогенный пресс, реагируют на этот процесс изменением видовой структуры, спектра экобиоморф, активности видов, доминантного комплекса и т.д.

Исследования нефтезагрязненных и рекультивируемых почв проводились с 2002 по 2008 год на базе агробиостанции БГПУ им. Акмуллы в лаборатории микробиологии кафедры биохимии и биотехнологии БашГУ и кафедре ботаники БашГУ.

В лабораторных и полевых условиях изучалось изменение ЦВЦ почвы (серая лесная), загрязненной нефтью, и почвы на разных стадиях рекультивации микробными препаратами. При биоремедиации были использованы: 1) биопрепарат нефтедеструктор «Ленойл», основанный на природном консорциуме микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species*; 2) биоудобрение комплексного действия «Азолен» на основе *Azotobacter vinelandii* ИБ 4; 3) биопрепарат Белвитамил, Пат. РФ № 2198748 - активный ил целлюлозо-бумажного производства, представляющий собой готовую смесь промышленной ассоциации аэробно-анаэробных микроорганизмов, содержащий углеродородокисляющие микроорганизмы родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas* (всего 10 видов).

При выявлении видового состава цианобактерий и водорослей использовали чашечные культуры со стеклами обрастания [1]. Оценку обилия видов водорослей проводили по 15-ти балльной системе [2]. Количественный учет почвенных водорослей проводили методом культурального подсчета [3]. Биомассу водорослей вычисляли объемно-расчетным методом [1].

Фоновая (ненарушенная) почва характеризовалась полночленностью цианобактериально-водорослевого ценоза с наличием всех таксономических групп: цианобактерии (*Cyanophyta*, *Cyanobacteria*) и зеленые (*Chlorophyta*), желтозеленые (*Xanthophyta*), диатомовые (*Bacillariophyta*) водоросли. Был идентифицирован 31 вид и внутривидовой таксон цианобактерий и водорослей, относящийся к 6 классам (*Chroococcophyceae*, *Hormogoniophyceae*, *Pennatophyceae*, *Xanthococcophyceae*, *Xanthotrichophyceae*, *Chlorophyceae*).

Наиболее устойчивы к нефтяному загрязнению по данным, полученным многими исследователями [4, 5, 7, 8] являются цианобактерии и зеленые водоросли. Наиболее чувствительными к загрязнению нефтью и нефтепродуктами оказались желтозеленые водоросли, которые можно рассматривать как показатели чистоты и «здоровья» почвы. Диатомовые водоросли также очень чувствительны к этим загрязнениям. Поэтому восстановление видового разнообразия желтозеленых и диатомовых водорослей может служить показателем детоксикации почвы после загрязнения нефтью.

В контроле доминантный комплекс характеризовался наличием представителей всех систематических групп: *Leptolyngbya foveolarum*, *Gloeocapsa turgida* (*Cyanophyta*), *Chlorella vulgaris*, *Klebsormidium nitens*, *Ulothrix variabilis* (*Chlorophyta*), *Pleurochloris anomale*, *Botrydiopsis eriensis* (*Xanthophyta*), *Hantzschia amphioxys*, *Navicula pelliculosa*, *Nitzschia palea* (*Bacillariophyta*). При загрязнении почвы нефтью в концентрациях 1 и 4% на 3 сут произошла унификация видового состава ЦВЦ. Так, в почвах с 1% нефти были выявлены виды цианобактерий, относящиеся к роду *Nostoc*: *Nostoc commune*, *Nostoc sp.*, *N. linckia*, *N. punctiforme*, а при 4%-ном загрязнении - *N. linckia*. Через 90 сут произошло восстановление видового разнообразия цианобактерий и только виды *Leptolyngbya foveolarum*, *Gloeocapsa turgida* при 4%-ном загрязнении не обнаруживались. Это, вероятно, связано с тем, что цианобактерии способны усваивать углеводороды нефти и занимать открытые пространства с повышенным рН среды [6]. Кроме того, виды рода *Nostoc* обладают высокой устойчивостью к поллютантам, их уникальные экологические свойства обусловлены способностью становиться эдификаторами ЦВЦ [9]. Среди зеленых водорослей наиболее устойчивым был вид *Chlorococcum infusionum*. В вариантах с кон-

центрацией нефти (8%) наблюдалась массовая гибель водорослей. Были обнаружены лишь представители вида *Nostoc linckia*.

Использование различных биопрепаратов для рекультивации нефтезагрязненных почв оказывало неоднозначное влияние на видовое разнообразие ЦВЦ как в фоновой, так и в загрязненной почве. Находясь в поверхностных слоях почвы, цианобактерии и водоросли быстро реагировали на внесение испытуемых веществ, показывая при этом неодинаковую реакцию различных групп на разные препараты.

Через 3 сут при внесении в фоновую почву биопрепарата Азолен наблюдалось снижение видового разнообразия зеленых и диатомовых водорослей и цианобактерий. Белвитамил, внесенный в фоновую почву, через 3 сут оказался наиболее токсичным из всех биопрепаратов. Избирательный характер действия биопрепаратов проявился и в варианте с внесением Ленойла. В фоновой почве через 3 сут происходило незначительное обеднение видового состава ЦВЦ. Через 90 сут после начала эксперимента все чувствительные по отношению к препаратам виды водорослей и цианобактерий адаптировались, и по численности и биомассе превосходили эти показатели в фоновой почве.

Наибольшее разнообразие видов цианобактерий и водорослей было отмечено в загрязненной почве, обработанной Ленойлом (табл.1). Под его действием наблюдалось снижение токсичности внесенной нефти. Применение Ленойла способствовало восстановлению видового разнообразия водорослей и цианобактерий при 1%-ном загрязнении. При концентрации нефтепродуктов 4% виды *Botrydiopsis eriensis* и *Bumilleriopsis terricola*, относящиеся к желтозеленым, выпали из нефтезагрязненного ЦВЦ, и не проявляли себя в течение оставшегося периода.

Рекультивация почвы, загрязненной нефтью в концентрации 8%, не привела к восстановлению видового разнообразия водорослей. В данных образцах почвы были обнаружены только представители цианобактерий, относящиеся к роду *Nostoc*. Очевидно, для восстановления видового состава водорослей необходима повторная обработка биопрепаратами или более длительное время для детоксикации поллютанта.

Показатели развития цианобактериально-водорослевых ценозов включены в многоуровневую систему биотестирования нефтезагрязненных почв (табл.2) . Предложен коэффициент биологической активности почв (БАП), включающий в себя уровень активности ферментов, показатели численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), микроскопических грибов, водорослей и цианобактерий, степень развития высших растений и педобионтов в исследуемой почве [10].

Таблица 1

Изменение качественного состава (число видов) и количественных характеристик (баллы обилия) ЦВЦ в зависимости от сроков наблюдения и варианта эксперимента

Сроки отбора проб, сут	К	К+Л	1%	1%+Л	4%	4%+Л
Число видов						
30	13	9	8	7	0	0
90	15	15	10	15	0	0
180	19	19	16	19	3	9
Во все сроки наблюдения	26	24	22	23	3	9
Степень развития ЦВЦ (баллы)						
30	69	58	13	24	0	0
90	88	87	35	66	0	0
180	97	77	56	62	3	16

Разработанная многокомпонентная тест-система позволяет получить надежные результаты при оценке характера и степени нефтяного загрязнения почвы. Ее можно включить как составную часть в систему экологического мониторинга почв техногенно-нарушенных территорий

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузяхметов Г.Г., Дубовик И.Е. Методика изучения почвенных водорослей: Учебное пособие. Уфа, 2001. – 56 с.
2. Кабиров Р.Р., Шилова И.И. Почвенные водоросли свалок и полигонов твердых бытовых и промышленных отходов в условиях промышленного города. // Экология, 1993. № 5. С. 10-18.
3. Водоросли: Справочник./ Под редакцией Вассера С.П. – Киев: Наукова думка, 1989. – с.608.
4. Дубовик И.Е. Влияние нефтепродуктов на почвенные водоросли// В сб.: Актуальные проблемы современной альгологии. Тезисы докладов. Черкассы, 1987. с.163
5. Дубовик И.Е. Водоросли эродированных почв и альгологическая оценка почвозащитных мероприятий // Уфа, изд-е Башк. ун-та, 1995, 156 с.
6. Зимонина Н.М. Почвенные водоросли нефтезагрязненных земель: (На примере Возейс. месторождения Усин. р-на Респ. Коми) / Киров ВГПУ, 1998- 171 с.
7. Кабиров Р.Р. Почвенные водоросли в системе экологического нормирования//В сб: Актуальные проблемы современной альгологии: Тезисы докл. III Междунар. конф., Харьков, 2005. С.64-65
8. Кузяхметов Г.Г., Попова Л.В., Исмагилова Л.Ш., Пальчикова О.И. Изучение действие тюменской товарной нефти на некоторые почвенные водоросли // Вклад ботаников Башкирии в осуществлении Продовольственной программы: Тез. докл научн. конф.- Уфа: БФАН СССР, 1984.- С. 79-81.
9. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В. Биоремедиационные возможности почвенных цианобактерий // Биологический мониторинг природно-техногенных систем. Сыктывкар, 2011. 388 с. (Коми научный центр УрО РАН) С. 26–38.
10. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Рафикова Г.Ф., Кабиров Т.Р., Григориади А.С. Мониторинг токсичности нефтезагрязненных почв по микробиологическим

показателям // Вестник Оренбургского государственного университета. 2007. – № 75. – С. 158-161.

УДК 582.232/275-193

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОЧВ Г. КИРОВА МЕТОДАМИ АЛЬГОИНДИКАЦИИ, ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Ефремова В.А., Кондакова Л.В.

Вятский государственный гуманитарный университет, г. Киров, Россия

Урбанизация является одной из глобальных проблем в современном мире. В данных условиях значительную техногенную нагрузку испытывают городские почвы. Необходимость оценки и степени нарушенности городских почв не вызывает сомнения. Почвенные водоросли и цианобактерии (ЦБ) широко используются для биоиндикации природных и антропогенных факторов воздействующих на почвы [Штина, Голлербах, 1976; Кабиров и др., 2010; Дубовик, Закирова, 2010 и др.]. Комплексное изучение почвенной среды с использованием методов альгологического, химического анализа и биотестирования позволяет оценить и прогнозировать экологическое состояние урбанизированных территорий.

Цель исследования – дать экологическую оценку почв г. Кирова методами альгоиндикации, химического анализа и биотестирования.

Объектами исследования являлись почвенные образцы, отобранные в промышленной, транспортной, селитебной и рекреационной зонах г. Кирова в 2007-2013 гг. Видовой состав водорослей определяли методом чашечных культур со стеклами оброста и микроскопирования свежевзятой почвы [Голлербах, Штина, 1969; Штина, Голлербах, 1976]. Количественный учет фототрофных микроорганизмов средних образцов почвы и пленок «цветения» проводили на мазках [Домрачева, 2005] прямым микроскопическим методом. Содержание валовых и подвижных форм тяжелых металлов (ТМ) в почве определяли методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии в аккредитованной экоаналитической лаборатории ВятГГУ. Биотестирование городских почв проводили с использованием ЦБ р. *Nostoc* тетразолюно-топографическим методом, а также с применением аттестованных методик с использованием тест-организмов разных трофических уровней: люминесцентных бактерий *Escherichia coli* тест-системы «Эколюм», простейших *Paramecium caudatum*, низших ракообразных *Daphnia magna Straus*.

В почвах г. Кирова выявлен 141 вид и разновидность почвенных водорослей и цианобактерий. Это составляет 23% от общего числа видов, известных для почв Кировской области и 13% для почв России [Штина, 1997]. Основу альгофлоры составляют представители отделов цианобактерий (38%) и зеленых водорослей (37%) (табл. 1).

Таблица 1.

Таксономическая структура общей альгофлоры почв г. Кирова

Отдел	Число таксонов					
	Классов	Порядков	Семейств	Родов	Видов	Видов и разновидностей
Cyanobacteria	1	2	10	16	52	54
Chlorophyta	4	14	22	28	52	53
Xanthophyta	1	4	5	8	14	14
Eustigmatophyta	1	1	1	2	4	4
Bacillariophyta	1	3	5	7	13	15
Euglenophyta	1	1	1	1	1	1
Всего	9	25	44	62	136	141

Показатель степени аридности (соотношение Cyanobacteria / Chlorophyta) для общей урбанофлоры г. Кирова составляет 1,0. Для лесной зоны данный показатель меньше единицы, для альгофлоры степной зоны – больше единицы [Кузяхметов, 2006]. Увеличение доли Cyanobacteria по сравнению с Chlorophyta отмечается для промышленной, транспортной и селитебной зон г. Кирова, показатель степени аридности для которых составляет 1,4; 1,2; 1,5 соответственно. Для рекреационной зоны данный показатель равен 0,8.

Экологический анализ альгофлоры по жизненным формам указал на преобладание в рекреационной зоне города водорослей X-, Ch- и P-форм, а в техногенной зоне – P, Ch, и B-форм.

Интегральное экологическое состояние почвенной среды отражает «цветение» почв. Количественные показатели альгофлоры определяли в слое 0-5 см и в пленках «цветения». Специфику «цветения» почвы в районе промышленной зоны г. Кирова рассматривали на примере Биохимического завода (БХЗ), ТЭЦ-5 и Кировского завода по обработке цветных металлов (ОЦМ).

Флористический состав пленок «цветения», отобранных осенью вблизи Биохимзавода, представлен 8 видами (рис. 1). Доминантом сообщества являлась гетероцистная ЦБ (ГЦБ) – *Nostoccommune*. Плотность популяций фототрофов в пленках «цветения» составила $63 \pm 7,0$ млн. кл./см² (рис. 2), в почвенных пробах (слой 0-5 см) – $0,3 \pm 0,0$ млн. кл./г почвы.

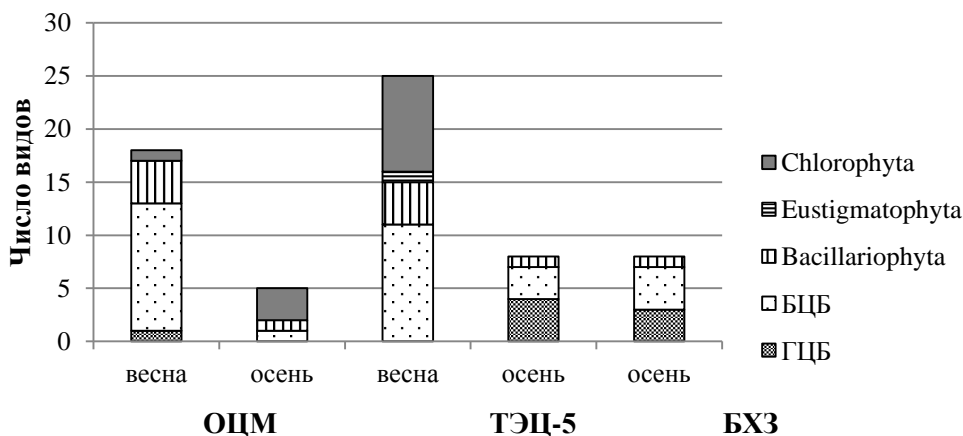


Рис. 1. Видовой состав биопленок «цветения» почвы в промышленной зоне г. Киров.

Прямым микроскопированием весенней пленки «цветения», взятой в районе ОЦМ, обнаружено 17 видов почвенных водорослей и ЦБ (рис. 1). Численность клеток составляла $13,8 \pm 1,3$ млн. кл./см² почвы, преобладали ЦБ – $13,2 \pm 1,2$ млн. кл./см² почвы (рис. 2). Видовой состав осенних биопленок данного района оказался беднее, было отмечено всего 5 видов, доминировали ЦБ. Численность доминанта в пленке «цветения» *Phormidium uncinatum* достигала $153,1 \pm 27,4$ млн. кл./см², а суммарная длина нитей составила 638 м/см². При этом численность клеток микрофототрофов в почвенных пробах в слое 0-5 см была значительно ниже – $5,1 \pm 0,4$ млн. кл./г почвы.

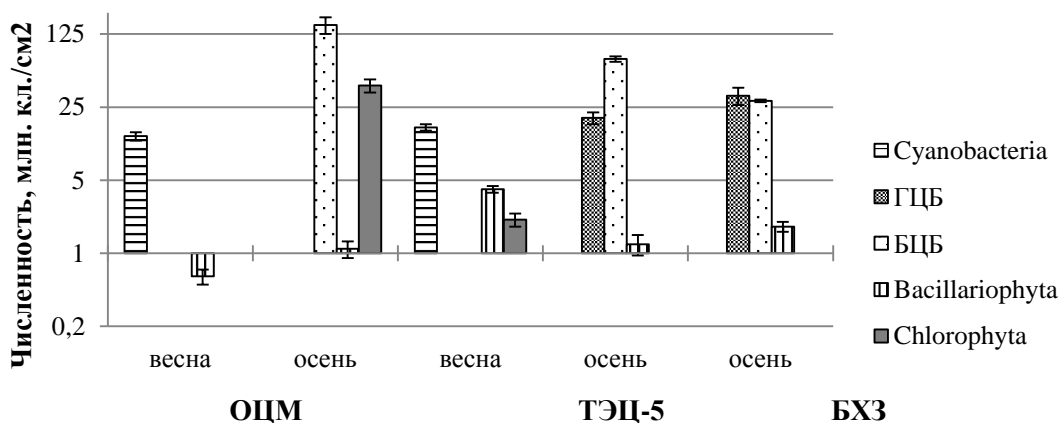


Рис. 2. Количественные показатели биопленок «цветения» почвы в промышленной зоне г. Кирова

В пленках «цветения», взятых весной в районе ТЭЦ-5, видовое разнообразие было представлено 25 видами (рис. 1). Общая численность клеток ЦБ и водорослей составила $22,2 \pm 1,7$ млн. кл./см² почвы. Преобладали ЦБ с численностью до $16,0 \pm 1,1$ млн. кл./см² почвы. Видовой состав осенних биопленок, как и в районе ОЦМ, был беднее по сравнению с весенними пробами и включал всего 8 видов, доминировали ГЦБ – *Nostoc commune* и *Microchaetetenera*. Численность составила $93,12 \pm 7,0$ млн. кл./см², количественные показатели водорослей в слое 0-5 см – $11,3 \pm 0,7$ млн. кл./г почвы.

По результатам химического анализа в изученных почвах г. Кирова отмечается высокое значение рН солевой вытяжки, которое варьирует от 7,1 до 7,9. Щелочная реакция почв города благоприятна для развития ЦБ. Содержание гумуса в городских почвах колеблется от 5,9% до 13,3%. В почвах на городских перекрестках валовые концентрации тяжелых металлов не превышают ОДК, однако содержание подвижных соединений довольно высокое: Zn – до 2 ПДК, Cu – до 2,6 ПДК, Ni – до 1,6 ПДК, Pb – до 1,2 ПДК. Суммарный показатель техногенного загрязнения (Zc) закономерно снижается по мере удаления от полотна дороги (от 4,8 на расстоянии 1 м от дороги до 2,8 на расстоянии 40 м от дороги). Абсолютные значения Zc соответствуют низкому уровню загрязнения.

Экологическая оценка почв методами биотестирования показала, что по индексу токсичности почва в ряде районов промышленной зоны является сверхтоксичной по тестированию с помощью ЦБ *Nostoc muscorum* (табл. 2). По результатам биотестирования с использованием тест-организмов *Daphnia magna* и *Paramecium caudatum* выявлено отсутствие острой токсичности. Тест-система «Эколюм» оказалась наиболее чувствительной к загрязнению городских почв в условиях острого опыта. Высокие индексы токсичности выявлены для некоторых перекрестков улиц с высокой автотранспортной нагрузкой (22,82 – 47,02), а также парка им. Ю.А. Гагарина и Александровского сада

Всероссийская конференция «Биотехнология – от науки к практике»
ПОЧВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОРЕМЕДИАЦИЯ ТЕХНОГЕННО-ЗАГРЯЗНЕННЫХ
ТЕРРИТОРИЙ

(24,22 – 33,81) на глубине 10-20 см. Тенденция увеличения токсичности почвы к осени более ярко проявляется в экспериментах с бактериями.

Таблица 2

Результаты биотестирования и химического анализа почв г. Кирова

		Функциональные зоны		
		Промышлен-	Транспорт-	Рекреацион-
Методы биотестирования				
<i>Daphnia magna</i> , смертность, %		–	0-6,7	0-6,9
<i>Paramecium caudatum</i> , индекс токсичности, у.е.		–	0-0,152	0-0,050
«Эколюм», индекс токсичности, у.е.		–	0-47,02	15,84-33,81
<i>N. paludosum</i> , индекс токсичности, у.е.		0,75-0,98	0,76-0,89	0,89
<i>Nlinckia</i> , индекс токсичности, у.е.		0,87-0,96	0,80-0,86	0,85
<i>N. muscorum</i> , индекс токсичности, у.е.		0,02-0,82	0,83-0,85	0,84
Методы химического анализа				
Zn	Подвижная форма (мг/кг)	14,9-17,5	16,6- 43,6	–
	Валовая форма (мг/кг)	63,9-64,1	68,9-182,5	–
Cu	Подвижная форма (мг/кг)	0,7-0,8	0,6- 7,9	–
	Валовая форма (мг/кг)	26,2-41,6	23,3-110,2	–
Cd	Подвижная форма (мг/кг)	0,1-0,2	0,1-0,2	–
	Валовая форма (мг/кг)	50-67	33-67	–
Ni	Подвижная форма (мг/кг)	0,8-1,1	0,6- 6,6	–
	Валовая форма (мг/кг)	25,0-28,6	22,5-73,5	–
Pb	Подвижная форма (мг/кг)	0,6-0,9	2,6- 7,5	–
	Валовая форма (мг/кг)	5,9-7,3	12,2-36,7	–

Примечание: жирным шрифтом выделены показатели, превышающие ПДК и ОДК, и показатели, свидетельствующие о токсичности пробы; знак “–” означает, что исследования не проводили.

Таким образом, для почв города характерно доминирование в альгогруппировках представителей отделов Cyanobacteria и Chlorophyta, необычайно высокая плотность популяций фототрофов в биопленках (63-194 млн. кл./см²). Комплексная оценка почв г. Кирова позволила установить, что наиболее загрязненной является транспортная зона г. Кирова. Данные альгофлоры почв г. Кирова подтверждаются результатами химического анализа и биотестирования. Транспортная нагрузка оказывает негативное воздействие на развитие желтозеленых водорослей, являющихся индикаторами чистых почв. В транспортной зоне видовое разнообразие желтозеленых водорослей составляет 9%, в рекреационной – 17%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Штина, Э. А. Экология почвенных водорослей / Э. А. Штина, М. М. Голлербах. – М.: Наука, 1976. – 143 с.
2. Кабиров, Р. Р. Модели трансформации сообществ почвенных водорослей в условиях антропогенного загрязнения / Р. Р. Кабиров, Л. А. Гайсина, Л. М. Сафиуллина, Г. Р. Бакиева, С. Ю. Сафиуллин // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах: Материалы Международной Научно-практической конференции, посвященной 100-

летию со дня рождения профессора Эмилии Адриановны Штиной, 11-15 октября 2010 г. – Киров: Вятская ГСХА, 2010. – С. 140 – 145.

3. Дубовик, И. Е. Суанорphyta в антропогенно - нарушенных почвах Республики Башкортостан / И. Е. Дубовик, З. Р. Закирова // Ботанический журнал. – 2010. – Т. 95. – № 1. – С. 3 – 12.

4. Голлербах, М. М. Почвенные водоросли / М. М. Голлербах, Э. А. Штина. – Л.: Наука, 1969. – 228 с.

5. Домрачева, Л. И. «Цветение» почвы и закономерности его развития / Л. И. Домрачева. – Сыктывкар, 2005. – 336 с.

6. Штина, Э. А. Флора водорослей бассейна реки Вятки / Э. А. Штина. – Киров: ОАО «Кировская областная типография», 1997. – 96 с.

7. Кузяхметов, Г. Г. Водоросли зональных почв степи и лесостепи / Г. Г. Кузяхметов; под ред. Б. М. Миркина. – Уфа: РИО БашГУ, 2006. – 286 с.

УДК 631.461.6

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ ТИПОВ ПОЧВ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН И КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Залилова Л.Р., Кеслер Н.А., Григориади А.С.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Загрязнение окружающей среды является важной проблемой современности. Развитие нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности приводит к экологическим проблемам в соответствующих регионах. Первая эксплуатационная скважина была пробурена на р. Кудако на Кубани в 1864 году (Краснодарский край). В Башкирии добыча нефти началась с 1932 из скважины у села Ишимбаево. С тех времен эти регионы стали важными центрами топливной энергетики России. В связи с интенсивным развитием данной отрасли промышленности неизбежно возникла проблема загрязнения почвы нефтью, нефтепродуктами и отходами нефтепереработки.

Целью данной работы стало изучение углеводородокисляющей активности основных типов почв Республики Башкортостан и Краснодарского края как показателя их способности к самовосстановлению после нефтяного загрязнения.

Исследования проводили в условиях модельного эксперимента на образцах чернозема выщелоченного Краснодарского края и серой лесной почвы Республики Башкортостан. Подготовленную почву искусственно загрязняли нефтью и дизельным топливом в концентрациях 1, 4 и 8 % от массы почвы. Почву тщательно перемешивали и увлажняли до 60% от полной влагоемкости.

Учет численности углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) проводили через 3, 30, 90 сут с момента поступления загрязнителя в почву общепринятым мето-

дом посева почвенной суспензии на жидкую среду Диановой-Ворошиловой [1]. Содержание остаточных нефтяных углеводов в почвенных образцах определяли методом горячей экстракцией метиленхлоридом [2].

Трансформация нефти начинается сразу после ее попадания в почву [3]. Способность усваивать углеводороды в качестве единственного источника углеродного питания нефти присуща микроорганизмам, представленным различными систематическими группами. Углеводородокисляющие микроорганизмы являются обычными членами биоценозов почв. Однако их активность и численность значительно варьирует, что, наряду со свойствами почвы, обуславливает способность почвы к восстановлению и очищению. Например, исследованиями В.Г. Гайворонского и С.И. Колесникова [4] показано, что черноземы более устойчивы к мазутному загрязнению, чем бурые лесные почвы. Это определяется их эколого-генетическими свойствами: более высокая поглотительная способность черноземов ведет к связыванию мазута, а более высокая биологическая активность ускоряет его разложение и детоксикацию.

Анализ результатов показал, что численность УОМ увеличивалась во всех образцах почвы. В первое время после загрязнения интенсивность роста микроорганизмов была относительно слабой, что связано с адаптацией микробиоценоза к новым экологическим условиям. Следует отметить, что в образцах загрязненного чернозема рост показателя характеризовался планомерностью и четкой зависимостью от концентрации нефти в почве на протяжении всего эксперимента. В серой лесной почве активность УОМ достигала такой закономерности только к концу опыта. В целом при максимальной концентрации загрязнителя численность микроорганизмов в разных типах почв была одинаковой. Однако при меньшем содержании поллютанта в окружающей среде при изучении образцов серой лесной почвы исследуемый параметр был значительно выше, чем для чернозема (рис. 1).

Анализ содержания остаточных углеводов в нефтезагрязненной почве продемонстрировал одинаковую интенсивность разложения как в серой лесной почве, так и в черноземе (рис.2). Общее снижение загрязнителя в почвах составило всего 15-22%, однако, если учитывать длительность сроков восстановления, можно говорить об удовлетворительной самоочищающей способности изучаемых почв.

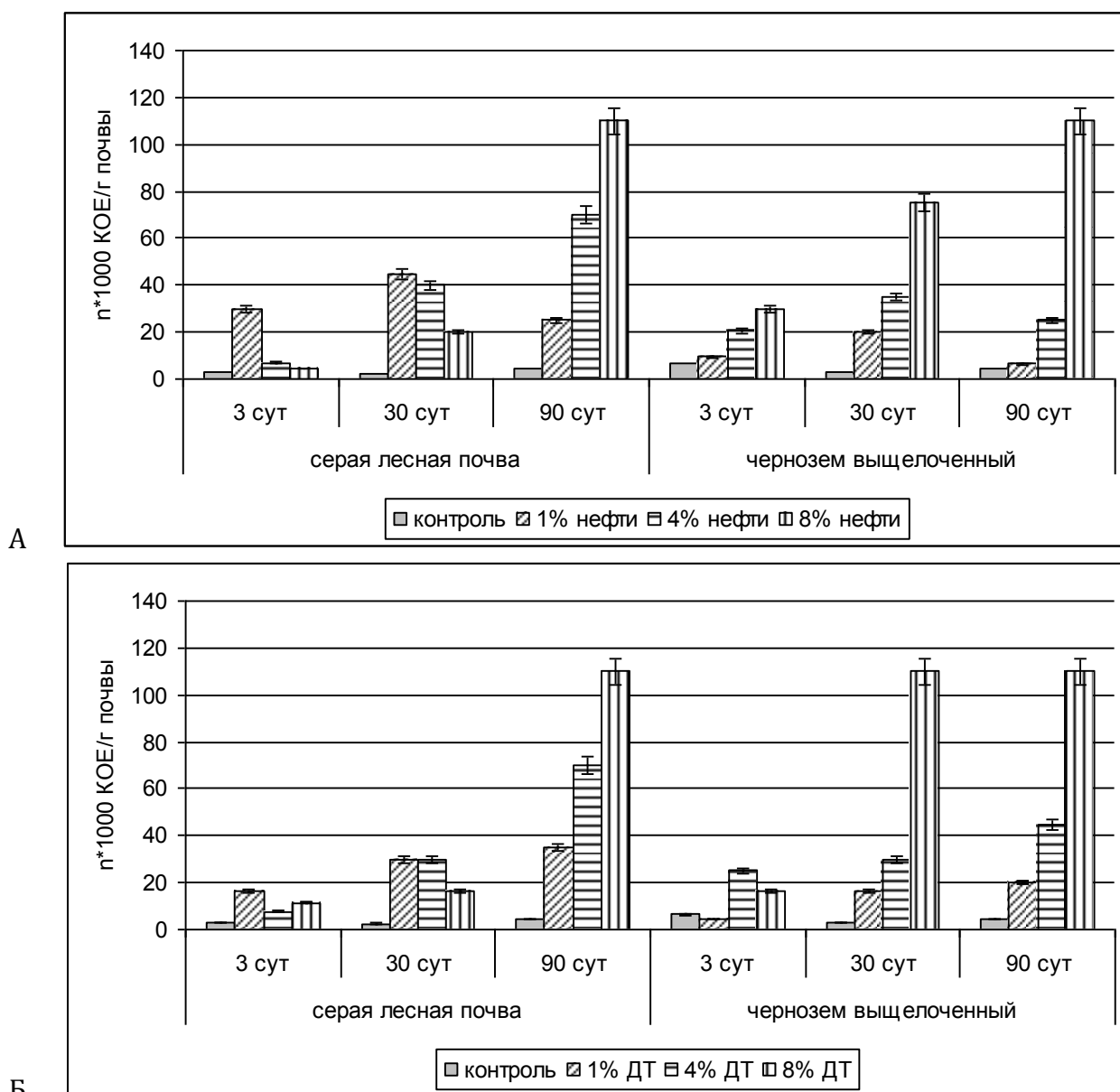


Рис. 1. Изменение численности углеводородокисляющих микроорганизмов в разных типах почв в условиях загрязнения нефтью (А) и дизельным топливом (Б).

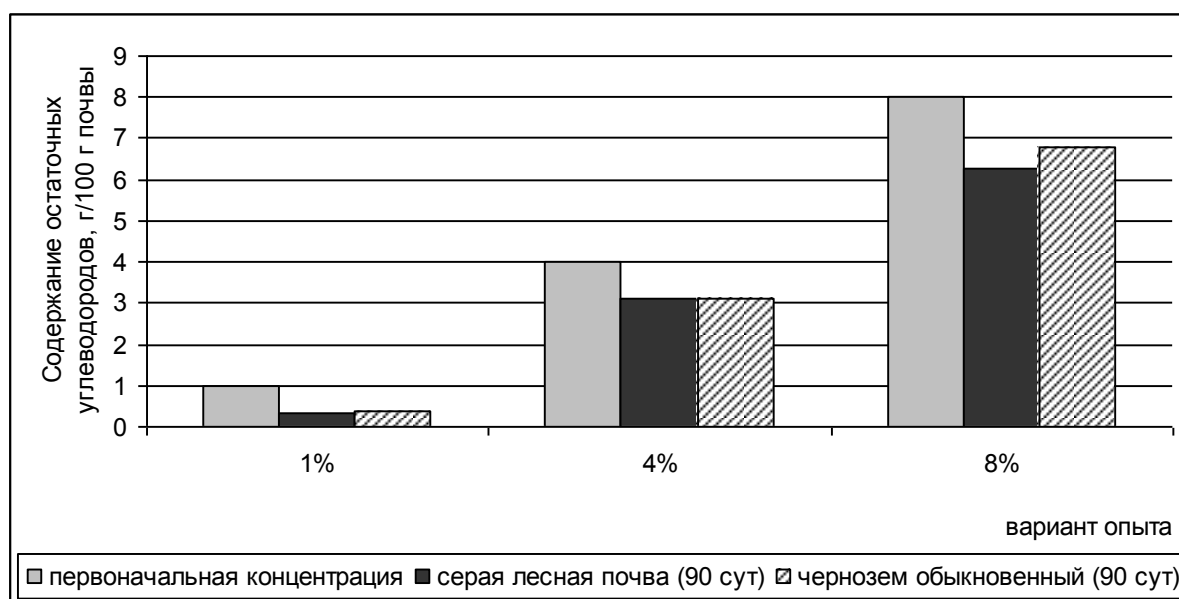


Рис. 2. Содержание остаточных углеводов в почве через 90 суток с момента загрязнения нефтью.

Таким образом, активность углеводородокисляющих микроорганизмов обоих типов почв была на высоком уровне для максимальных исследуемых концентраций нефти и дизельного топлива. Однако отмечались различия в течение процесса первичной реакции микробоценоза на экстремальные условия, связанные с поступлением в почву поллютантов. Серая лесная почва характеризовалась более медленными темпами наращивания углеводородокисляющей активности, но в результате рассмотрения всех вариантов загрязнения демонстрировала более высокое содержание микроорганизмов, специализирующихся на утилизации нефтяных углеводородах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии. / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Перевезева // Под ред. В.К. Шильниковой. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
2. McGill W.B., Rowell M.J. Determination content of oil contaminated soil // *Sci. Total/ Environ.*, 1980. v. 14.№3. P. 245–253.
3. Исмаилов Н.И., Пиковский Ю.И. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель // *Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем*. М.: Наука, 1988. С. 222-236.
4. Гайворонский, В.Г. Моделирование загрязнения почв мазутом с целью установления его экологически безопасной концентрации / В.Г. Гайворонский, С.И. Колесников // *Известия вузов. Северо-Кавказский регион*. – 2008. – №4. – С. 86-88.

УДК 502.52(23):502.13(470.1/22)

АЛЬГОИНДИКАЦИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ РЕМЕДИАЦИОННЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ПОРОДНЫХ ОТВАЛОВ УГЛЕДОБЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В УСЛОВИЯХ КРАЙНЕГО СЕВЕРА

Зимонина Н. М.

Вятский государственный гуманитарный университет, г. Киров, Россия

В результате длительной эксплуатации месторождений угля Печорского бассейна (Воркутинский промышленный район) обширные площади оказались занятыми породными отвалами, которые являются постоянными источниками геохимического загрязнения окружающей среды [9]. Образование плотного слоя дернины на поверхности данных техногенных объектов снижает их отрицательное влияние на прилегающие территории. Естественное зарастание отвалов в суровых климатических условиях Крайнего Севера протекает медленно. Для ускорения процессов образования на поверхности отвалов устойчивого почвенно-растительного покрова, в процессе технической рекультивации поверхность отвалов выравнивается и наносится слой потенциально – плодородных грунтов (четвертичный суглинок) [6]. Почвенные водоросли являются первопоселенцами техногенных субстратов и играют важную роль, как первичные продуценты и индикаторы экотопических условий техногенных местообитаний.

Цель настоящего исследования – оценка количественных характеристик (количество клеток, биомасса, продукция) сообществ водорослей угольных отвалов, как показателей эффективности ремидиационных мероприятий, проводимых на этапе технической рекультивации.

Исследование проведено в рамках комплексного экологического мониторинга на отвалах закрытой шахты «Юнь – Яга» на базе Республиканского экологического центра по изучению и охране восточно-европейских тундр при Минприроды Республики Коми под руководством д.б.н. М. В. Гецен.

Материалы и методы

Юньягинское месторождение каменного угля расположено за полярным кругом в северо-восточной части Печорского угольного бассейна и относится к подзоне южных гипоарктических тундр. Климат района субарктический с резкими колебаниями температуры воздуха и давления.

Отбор проб почвенных водорослей осуществлялся с учетных площадок (1 м²), расположенных на трансекте, пересекающей плоские вершины отвалов. Из слоя 0–1.5 см грунта составлялся смешанный образец объемом 150 см³. В среднем 11-кратная повторность подсчёта смешанного образца показала 10–15 % ошибку полученных средних данных. Количественный учет водорослей проводился методом прямым счёта С. Н. Виноградского в модификации Э. А. Штиной [2]. При определении биомассы использовался объемно-расчётный метод. При этом измерялась каждая встреченная клетка или особь. Продукция почвенных водорослей вычислялась путем суммирования достоверных суточных приростов биомассы в течение 10 сут. [4].

Для альгологического количественного анализа были отобраны преобладающие на поверхности отвалов грунты: четвертичные суглинки (участки рекультивации) и

углистые аргиллиты (участки естественного зарастания), в двух вариантах растительных сообществ на участках пионерного зарастания с общим проективным покрытием ОПП – 10 % и в сомкнутых разнотравно-злаковых сообществах лугового типа ОПП – 100%. Четвертичный суглинок характеризуется нейтральной и слабощелочной реакцией среды (рН 6.5–8.2), относительным содержанием азота – 0.1–0.2 %, углерода – 1.6–3.0 %, концентрацией калия – 16.5 мг на 100 г грунта и фосфора – 26,5 мг/100 г. Углистый аргиллитовый щебень со слабокислой и нейтральной реакцией среды (рН 5.9–6.6) и содержанием азота – 1.1–1.4 %, углерода – 23.7–29.1 %, фосфора – 5.9 мг/100 г, калия – 11.1 мг/100 г [3; 8].

Результаты и обсуждение

Участки рекультивированные суглинком (суглинистые субстраты). В альгогруппировках разных местообитаний численность и биомасса водорослей варьируют в широких пределах. Наибольшая численность клеток $1135 \cdot 10^3$ в 1 г грунта отмечена на суглинистом субстрате без высших растений, где основу численности (98 %) и биомассы (85 %) составляют синезелёные водоросли. По результатам ранее проведенного альгофлористического анализа техногенных суглинков Юньягинского месторождения [1; 7] и нашим наблюдениям [5] на этом субстрате наиболее часто встречаются виды рода *Phormidium*: *P. ambiguum* Gom., *P. foveolarum* (Mont.) Gom./*Leptolyngbya foveolarum* (Montagne ex Gom.) Anagn. et Kom., *P. animale* (Ag. ex Gom.) Anagn. et Kom./*Oscillatoria animalis* Ag., *P. calcereum* Kütz., *P. autumnale* Ag. ex Gom. и *P. lividum* Näg. Виды этого рода принадлежат к Р-жизненной форме, которые обычно тяготеют к голым участкам минеральной почвы и устойчивы к засухе благодаря свойствам протопласта.

Среди синезелёных по числу клеток лидирующие позиции занимают тонкие нити с шириной трихома 2–3.3 мкм (*Phormidium foveolarum*, *P. animale* и *Leptolyngbya boryana* (Gom.) Anagn. et Kom., составляя 39 % от числа клеток синезелёных, а по биомассе преобладают формы с шириной трихома 5.5–6.5 мкм (*P. autumnale* и *P. lividum*), составляя 48 % (48 кг/га) общей биомассы синезелёных в данном местообитании. Техногенные грунты Юньягинского месторождения слабо обеспечены азотом [6]. В связи с этим особый интерес представляет нахождение на суглинках азотофиксирующих гетероцистных форм синезелёных водорослей (цианобактерий). Именно для суглинистых субстратов характерно наиболее интенсивное, по сравнению с другими участками, развитие гетероцистных форм синезелёных водорослей на участке пионерного зарастания их биомасса составила – 1.1 кг/га. В основном это представитель рода *Anabaena* – *A. variabilis* Kütz., а так же виды рода *Nostoc* – *N. punctiforme* (Kütz.) Hariot. и *N. linckia* (Roth.) Born. ex Born. et Flah. с биомассой от 0.07 до 0.1 кг/га.

На задернованном суглинке под разнотравно-злаковой растительностью в структуре биомассы увеличивается доля одноклеточных зелёных водорослей, хотя по количеству клеток лидирующие позиции сохраняют синезелёные водоросли. Такие изменения структуры произошли, прежде всего, за счёт выпадения из состава водорослей задернованного суглинка нитчатых синезелёных форм с шириной трихомов 5.5–6.5 мкм – *Phormidium autumnale* и *P. Lividum*. Зарастание суглинка высшими растениями сопровождается появлением крупноклеточной диатомеи *Hantzschia amphioxys* var. *subsalsa* Wisl. et Poretzky (средний объем клеток 1892 мкм^3), которая в количественных пробах с участка пионерного зарастания не была отмечена. На задернованном суглинке по сравнению с незадернованным количественные

показатели популяций водорослей были ниже (численность клеток – более чем в 5 раз, а биомасса – в 2 раза). Характер изменений этих показателей определяют господствующие на суглинках синезелёные водоросли.

Участки самозарастающие (аргиллитовый щебень). В заселении углистых аргиллитов ведущую роль играют одноклеточные зелёные водоросли, представленные Ch-жизненной формой. Отличаясь лабильностью питания и устойчивостью протопласта, эти водоросли выдерживают экстремальные условия влажности и температуры. В ходе сингенеза, меняется доля участия отдельных таксономических групп водорослей в сложении численности и биомассы. На стадии пионерного зарастания численность одноклеточных зеленых водорослей составила 54 тыс. в 1 г грунта, биомасса – 6,9 кг/га. В разнотравно – злаковых сообществах на задернованном щебне по сравнению с «голым» грунтом, биомасса зеленых водорослей увеличивается до 9,7 кг/га, на фоне снижения количества клеток до 41 тыс. в 1 г грунта, что может быть связано, как со сменой видового состава, так и преобладанием процессов роста над процессами размножения. Под разнотравно злаковой растительностью, по сравнению с незадернованным щебнем, количество и биомасса синезеленых и диатомовых водорослей увеличиваются. Численность синезеленых возрастает с 19 до 54 тыс. в 1 г грунта, биомасса с 0,13 до 1,51 кг/га. Численность диатомовых увеличивается с 2 до 7 тыс. кл/г, биомасса с 0,8 до 5 кг/га.

Гетероцистные синезелёные водоросли на аргиллитовом щебне малочисленны и составляют от 3 до 7 % численности клеток синезелёных, а их биомасса колеблется от 0.01 до 0.05 кг/га. Полученные нами значения биомассы сопоставимы с минимальными величинами биомассы водорослевых сообществ угольных отвалов Кузбасса с доминированием синезелёных водорослей (0.2 кг/га, 5 кг/га, 32 кг/га) [10].

Таким образом, наибольшие значения биомассы отмечены на незадернованном суглинке, где она является производной более чем 1 млн. клеток нитчатых синезелёных водорослей, и на щебне под разнотравно-злаковой растительностью, где основу данного показателя составляли крупноклеточные зелёные и диатомовые водоросли с самыми высокими значениями средних объёмов клеток среди водорослей исследованных экотопов.

Наиболее полно вклад водорослей в почвообразование характеризует количество создаваемой ими продукции. Продукция определялась путём суммирования достоверных прибавок биомассы за исследуемый период (10 дней). Продуктивность водорослевых сообществ в разных местообитаниях отличалась в три и более раз. Наибольшая продуктивность характерна для альгогруппировок незадернованных суглинка и щебня 32 и 26 кг/га соответственно, что в пересчёте на вегетационный сезон составляет вполне существенную цифру 288 и 234 кг/га. Присутствие высших растений снижает продуктивность водорослевых сообществ до 14,4 кг/га на щебне и до 9,5 кг/га; на суглинке.

Заключение

Таким образом, на породных отвалах Юньягинского угольного месторождения почвенные водоросли являются первопоселенцами и принимают активное участие в создании органического вещества. Биомасса водорослей на отвалах колеблется в пределах 5,4 – 15,2 кг/га (0,02 – 0,06 мг/г грунта). Численность клеток от 75 тыс./г до более чем 1 млн. клеток в 1 г грунта.

На отвалах шахтных пород в первую очередь поселяются одноклеточные зелёные водоросли, приспособленные к перенесению экстремальных условий среды. Участки отвалов, рекультивированные суглинком активно осваиваются нитевидными

синезелеными водорослями, которые предпочитают минеральные субстраты, щелочные условия среды и устойчивы к недостаткам влаги. На нерекультивированных отвалах аргиллитового щебня интенсивно развиваются диатомовые водоросли. На начальных этапах почвообразования наиболее ценным, по видимому, следует считать органическое вещество нитчатых синезеленых водорослей, способных фиксировать атмосферный азот. Наибольшее участие в создании биомассы, данные водоросли принимают на суглинистых субстратах, здесь они образуют до 38% (0,31 кг/га) общей биомассы водорослей, что позволяет положительно оценить использование суглинка для технической рекультивации, а биомассу клеток доминантных видов альгогруппировок можно рассматривать как вполне информативный показатель особенностей экотопических условий местообитаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева, В. М. Почвенные неподвижные зелёные микроводоросли (*Chlorophyta*) в зоне промышленного загрязнения г. Воркуты (Республика Коми) [Текст] / В. М. Андреева // Новости систематики низших растений. – 2006. – Т. 40. – С. 13–18.
2. Голлербах М. М. Почвенные водоросли [Текст] / М. М. Голлербах, Э. А. Штина. - Л.: Наука, 1969. - 228 с.
3. Денева С. В. Физико-химические свойства почв Западной части месторождения под воздействием карьера [Текст] / С. В. Денева // Природная среда тундры в условиях открытой разработки угля (на примере Юньягинского месторождения) / отв. ред. М. В. Гецен. – Сыктывкар : Коми республ. тип., 2005. – С. 102–112.
5. Домрачева Л. И. Почвенные водоросли как продуценты органического вещества и их значение в трофических связях почвенных организмов [Текст]: автореф. дис. канд. биол. наук.03.00.05 / Домрачева Людмила Ивановна, МГУ, - М., 1974. - 30 с.
6. Зимонина, Н. М. Альгогруппировки техногенных субстратов в районах угле- и нефтедобычи Европейского Северо-Востока (Республика Коми) [Текст] / Н. М. Зимонина // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем. Кн. 2 : материалы X всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 4–5 дек. 2012 г. / [редкол.: Т. Я. Ашихмина и др.]. – Киров : Лобань, 2012. – С. 131–134.
7. Красавин, А. П. Восстановление растительного покрова на отработанных землях угольной промышленности [Текст] / А. П. Красавин, И. В. Катаева // Город в Заполярье и окружающая среда : тр. III междунар. конф. (Воркута, 2–6 сент. 2003 г.) / отв. ред. М. В. Гецен. – Сыктывкар : Коми республ. тип., 2003. – С. 179–184.
8. Патова, Е. Н. Почвенные водоросли [Текст] / Е. Н. Патова, М. Ф. Дорохова // Природная среда тундры в условиях открытой разработки угля (на примере Юньягинского месторождения) / отв. ред. М. В. Гецен. – Сыктывкар : Коми республ. тип., 2005. – С. 126–143.
9. Первые итоги комплексных исследований на промплощадке закрытой шахты «Юнь-Яга» и прилегающей территории ненарушенной тундры в целях организации биологического мониторинга [Текст] / М. В. Гецен [и др.] // Эколого-экономические и социальные проблемы Воркутинского промышленного района (поиск путей решения и обеспечения стабильности) : тем. сб. / отв. ред. М. В. Гецен. – Воркута ; Сыктывкар : Коми республ. тип., 2000. – С. 80–110.
10. Рубцов А. И. Эколого-геохимический мониторинг на территории Юньягинского месторождения [Текст] / А. И. Рубцов // Природная среда тундры в условиях открытой разработки угля (на примере Юньягинского месторождения) / отв. ред. М. В. Гецен. – Сыктывкар : Коми республ. тип., 2005. – С. 180–211.

11. Шушуева, М. Г. Развитие водорослей на отвалах Красногорского угольного разреза [Текст] / М. Г. Шушаева // Проблемы рекультивации земель в СССР / под ред. С. С. Трофимова. – Новосибирск : Наука, 1974. – С. 188–194.

УДК 631.46:576.809.51

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЬГОФЛОРЫ ПОЧВ ФОНОВОЙ И ИСПЫТЫВАЮЩИХ ТЕХНОГЕННУЮ НАГРУЗКУ ТЕРРИТОРИЙ (НА ПРИМЕРЕ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ)

Кондакова Л.В.^{1,2}, Домрачева Л.И.^{1,3}

¹Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

²Вятский государственный гуманитарный университет, г. Киров

³Вятская государственная сельскохозяйственная академия, г. Киров, Россия

Почвенные водоросли и цианобактерии (ЦБ) являются признанными индикаторами экологического состояния среды обитания [1 – 4]. Альгологический мониторинг, являющийся составной частью комплексного мониторинга техногенно нарушенных территорий, применяется в оценке состояния и ремедиации техногенно загрязнённых почв. Почвенные фототрофные сообщества формируются под влиянием комплекса природных факторов, важнейшими из которых являются влажность, световой режим, реакция почвенной среды. Загрязнение почв вызывает определенные изменения в видовом и групповом составе альгосинузий.

Целью исследования являлось выявление реакции почвенных водорослей и ЦБ на техногенное воздействие в природных экосистемах.

Объекты и методы исследования. Работа выполнялась в рамках комплексных исследований техногенных территорий, проводимых лабораторией биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ. К техногенно преобразованным территориям в рамках исследования отнесены зоны влияния вблизи объекта хранения и уничтожения химического оружия (ОХУХО) «Марадыковский», предприятий Кирово-Чепецкого химического комбината (КЧХК) и Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов в Кировской области.

Видовой состав почвенных водорослей изучали общепринятыми в почвенно-альгологических исследованиях методами [5]: микроскопированием свежевзятой почвы и культуральными методами, из которых предпочтение отдавали чашечным культурам со стеклами обрастания.

Результаты исследования. Сравнительный анализ видового состава альгофлоры почв фоновой территории (ГПЗ «Нургуш») с альгофлорой территорий, испытывающих техногенную нагрузку, выявил существенные различия. По сравнению с альгофлорой заповедника, в почвах с территории ОХУХО выше процентное представительство ЦБ и ниже – жёлтозелёных и эустигматофитовых водорослей (табл. 1). Согласно нашим наблюдениям и литературным данным, в почвах, испытывающих антропогенную нагрузку, перестройка состава альгофлоры происходит в сторону увеличения разнообразия ЦБ и уменьшения разнообразия жёлтозелёных водорослей. Альгофлора лесных

фитоценозов ОХУХО характерна для зонального типа почв. Отмечено преобладание зелёных водорослей (представители родов *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Coccomyxa*, *Stichococcus*, *Klebsormidium*), жёлтозелёных и эустигматофитовых (виды родов *Botrydiopsis*, *Characiopsis*, *Eustigmatos*). Соотношение основных отделов почвенных водорослей лесных фитоценозов объекта ОХУХО и заповедника почти совпадает. Различия проявляются на видовом уровне. Отмечено снижение видового разнообразия альгофлоры по сравнению с контрольными участками, что согласуется с данными других исследователей [6].

Таблица 1

Видовой состав водорослей и ЦБ в почвах фоновой и техногенных территорий Кировской области (1 – число видов, 2 – процент)

Объект	Cyanobacteria		Chlorophyta		Xanthophyta и Eustigmatophyta		Bacillariophyta		Всего видов	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Сводные данные по Кировской обл. [7]	166	27,7	239	39,9	122	20,4	66	11,0	599*	100
ГПЗ «Нургуш»	27	27,3	42	42,4	24	24,2	6	6,1	99	100
ОХУХО	40	32,0	52	41,6	22	17,6	10	8,0	125*	100
КЧХК	8	19,0	23	54,8	5	11,9	6	14,3	42	100
Кильмезский полигон захоронения ядохимикатов	8	12,7	35	63,6	10	18,2	3	5,4	55	100

* – встретились представители других отделов

В почвах луговых фитоценозов объекта выявлено 123 вида водорослей, преобладают зелёные водоросли (39,2%) и ЦБ (30,8%), жёлтозелёные водоросли составляют 19,2% (табл. 1).

Таблица 2

Видовой состав водорослей в почвах фитоценозов ГПЗ «Нургуш» и техногенных территорий Кировской области

Объект	Фитоценоз	Состав альгофлоры
ГПЗ «Нургуш»	Лес	C ₁₅ Z ₃₀ J ₁₅ D ₃
	Луг	C ₂₂ Z ₃₃ J ₂₂ D ₆
	Всего	C ₂₇ Z ₄₂ J ₂₄ D ₆
ОХУХО	Лес	C ₁₆ Z ₃₂ J ₁₅ D ₈
	Луг	C ₃₇ Z ₄₇ J ₂₃ D ₁₂ Dr ₁
	Всего	C ₄₁ Z ₅₃ J ₂₃ D ₁₂ Dr ₁
КЧХК	Луг	C ₈ Z ₂₃ J ₅ D ₆
Кильмезский полигон захоронения ядохимикатов	Всего	C ₇ Z ₃₃ J ₁₂ D ₃

Обозначения: С – синезелёные (ЦБ); Z – зелёные; J – жёлтозелёные; D – диатомовые; Dr – другие отделы.

В почвах района КЧХК, представленных пойменными луговыми фитоценозами, выявлено 42 вида (табл. 1, 2). Наибольшее видовое разнообразие образуют зелёные водоросли: виды родов *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorella vulgaris*, *Bracteacoccus minor*, *Coccomyxa confluens*. Из десмидиевых водорослей, показателей избыточно увлажнённых почв, встречаются *Closterium pusillum*, *Penium borgeanum*, *Cosmarium cucumis*. Диатомовые водоросли при незначительном видовом разнообразии представлены широко распространёнными в почвах видами: *Hantzschia amphyoxyis*, *Pinnularia borealis*, *Nitzschia palea*, *Luticola mutica*, *Navicula pelliculosa*, *Stauroneis anceps*. Жёлтозелёные и эустигматофитовые водоросли составляют 17,8% видового разнообразия. Это представители родов *Eustigmatos*, *Peurochloris*, *Botrydiopsis*, *Chlorocloster*, *Heterococcus*. ЦБ представлены в основном безгетероцистными нитчатыми формами: представителями родов *Phormidium*, *Leptolyngbya*. По сравнению с альгофлорой ГПЗ «Нургуш», структура группировок почвенных водорослей района КЧХК изменяется в сторону увеличения процентного соотношения зелёных водорослей и уменьшения ЦБ при почти полном отсутствии азотфиксаторов. Перегрузка почв доступным азотом влечёт за собой отсутствие в ней азотфиксирующих ЦБ [8]. Данные почвы существенно различаются и по микробиологическим показателям [9]. Их особенностью является слабый уровень развития бактерий рода *Azotobacter* и микромицетов.

В почвах в районе Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов видовой состав альгофлоры представлен в основном зелёными водорослями, отмечено низкое видовое разнообразие диатомовых водорослей и ЦБ.

Видовой состав доминирующих видов водорослей и ЦБ сравниваемых объектов представлен в таблице 3.

Для того, чтобы оценить взаимные связи альгофлоры различных объектов, были подсчитаны флористические коэффициенты (табл. 4). Высокие значения коэффициентов Жаккара и Сьеренсена-Чекановского указывают на сходство сравниваемых альгофлор. Следует отметить, что сравниваемые объекты, кроме Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов, расположены в пойме реки Вятки, что предполагает исходную близость видового состава фототрофов.

Таблица 3

Доминирующие виды водорослей и ЦБ в почвах фитоценозов
фоновой и техногенных территорий Кировской области

Объект	Фито- ценоз	Виды водорослей
ГПЗ «Нургуш»	Лес	<i>Chlamydomonas gloeogama, Chlorococcum infusionum, Bracteacoccus minor, Chlorella vulgaris, Klebsormidium flaccidum, Eustigmatos magnus, Pleurochloris lobata, Xanthonema exile</i>
	Луг	<i>Phormidium autumnale, Ph. boryanum, Leptolyngbya foveolarum, Nostoc punctiforme, N. paludosum, Pleurochloris commutata, Botrydiopsis eriensis, Eustigmatos magnus, Chlamydomonas gloeogama, Ch. gelatinosa, Chlorella vulgaris, Bracteacoccus minor, Chlorococcum infusionum, Klebsormidium flaccidum, Hantzschia amphioxys, Luticola mutica</i>
ОХУХО	Лес	<i>Chlamydomonas gloeogama, Chlorococcum infusionum, Chlorella vulgaris, Coccomyxa solarinae</i>
	Луг	<i>Cylindrospermum muscicola, C. licheniforme, Nostoc muscorum, Phormidium formosum, Eustigmatos magnus, Botrydiopsis eriensis, Characiopsis minima, Xanthonema bristolianum, Chlamydomonas gloeogama, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Klebsormidium flaccidum, Hantzschia amphioxys</i>
КЧХК	Луг	<i>Bracteacoccus minor, Chlamydomonas gloeogama, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Coccomyxa confluens, Botrydiopsis eriensis, Hantzschia amphioxys, Nitzschia palea, Navicula pelliculosa</i>
Кильмезский полигон захоронения ядохимикатов	Луг	<i>Bracteacoccus minor, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Coccomyxa solarinae, Chlamydomonas gloeogama, Eustigmatos magnus</i>

Таблица 4

Коэффициенты Жаккара и Сьеренсена-Чекановского альгофлоры
фоновой и техногенных территорий Кировской области (%)

Жаккара Сьеренсена- Чекановского	ГПЗ «Нургуш»	ОХУХО	КЧХК	Кильмезский полигон захоронения ядохимикатов
ГПЗ «Нургуш»		50,3	38,2	32,7
ОХУХО	67,0		29,4	29,5
КЧХК	55,3	45,5		32,4
Кильмезский полигон	53,2	45,5	51,1	

В спектрах жизненных форм альгофлоры фоновой территории и техногенных объектов преобладают виды-пациенты X-, Ch- и C- жизненных форм, виды теневыносливые, устойчивые к экстремальным условиям, могут образовывать обильную слизь,

обитают как в толще почвы так и на её поверхности. Представители Р-жизненной формы – это нитчатые ЦБ, тяготеющие к голым участкам минеральной почвы и обладающие ксероморфной структурой (табл. 5).

Таблица 5

Спектр жизненных форм почвенных водорослей и ЦБ
 фоновой и техногенных территорий Кировской области

Объект	Фитоценоз	Жизненная форма
ГПЗ «Нургуш»	Всего	X ₂₇ C ₂₂ P ₁₇ Ch ₁₄ H ₉ B ₆ hydr ₂ M ₁ amph ₁
	Лес	C ₁₆ Ch ₁₂ P ₁₁ X ₁₁ H ₇ B ₃ M ₁ hydr ₁ amph ₁
	Луг	X ₂₀ Ch ₁₂ P ₁₁ C ₁₁ H ₈ B ₆ hydr ₂
ОХУХО	Всего	C ₂₇ X ₂₅ P ₂₃ Ch ₁₅ hydr ₁₄ B ₁₂ H ₁₀ M ₂ amph ₂
	Лес	C ₂₀ X ₁₅ Ch ₁₀ P ₈ B ₈ H ₆ hydr ₃ amph ₁
	Луг	C ₂₅ P ₂₂ X ₂₂ hydr ₁₃ Ch ₁₂ B ₁₂ H ₁₀ M ₂ amph ₂
КЧХК	Луг	X ₇ C ₆ Ch ₁₀ P ₆ B ₆ H ₃ amph ₂ hydr ₂
Кильмезский полигон		Ch ₁₅ C ₁₃ X ₁₀ hydr ₆ H ₅ P ₃ B ₃

Таким образом, исследование состояния альгофлоры почв фоновой и техногенных территорий позволяет сделать следующие выводы:

1. Альгофлора почв луговых и лесных фитоценозов ГПЗ «Нургуш» достаточно разнообразна и имеет характерный зональный тип соотношения основных отделов почвенных водорослей.

2. Флористический анализ состава почвенных водорослей района ОХУХО, в сравнении с альгофлорой заповедника, выявил незначительные изменения в структуре группировок водорослей: снижение видового разнообразия жёлтозелёных водорослей, чувствительных к техногенной нагрузке, и увеличение разнообразия цианобактерий. В большей степени эти изменения касаются луговых фитоценозов.

3. В почвах района КЧХК отмечена существенная перестройка структуры группировок почвенных водорослей: разнообразие зелёных водорослей при почти полном отсутствии азотфиксирующих ЦБ, что указывает на загрязнение почв минеральными формами азота.

4. Кардинальная перестройка альгофлоры выявлена в почвах в окрестностях Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов, где видовое разнообразие зелёных водорослей составляет 54,8% видового состава. Это в 1,5 раза выше процентного соотношения зелёных водорослей в почвах заповедника. При этом видовое разнообразие ЦБ и диатомовых водорослей в 2 раза ниже.

ЛИТЕРАТУРА

1. Штина, Э.А. Почвенные водоросли как экологические индикаторы / Э.А. Штина // Ботанический журнал. – 1990. – Т.75. – №4. – С. 441-452.
2. Кабиров, Р. Р. Альтотестирование и альгоиндикация [Текст] / Р.Р. Кабиров. – Уфа: БГПИ, 1995. – 125 с.
3. Дубовик, И.Е. Водоросли эродированных почв и альгологическая оценка почвозащитных мероприятий / И.Е. Дубовик. – Уфа: Изд-во Башк. ун-та, 1995. – 156 с.
4. Кузяхметов, Г.Г. Водоросли зональных почв степи и лесостепи / Г.Г. Кузяхметов. – Уфа: РИО БашГУ, 2006. – 286 с.

5. Штина, Э.А. Экология почвенных водорослей / Э.А. Штина, М.М. Голлербах. – М.: Наука, 1976. – 143 с.
6. Новаковская, И.В. Почвенные водоросли еловых лесов и их изменения в условиях аэротехногенного загрязнения / И.В. Новаковская, Е.Н. Патова. – Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2011. – 128 с.
7. Штина, Э.А. Флора водорослей бассейна реки Вятки / Э.А. Штина. – Киров, 1997. – 96 с.
8. Штина, Э.А. Альгологический мониторинг почв / Э.А. Штина, Г.М. Зенова, Н.А. Манушарова // Почвоведение. – 1998. – № 12. С. 1449–1461
9. Злобин, С.С. Использование методов биоиндикации, биотестирования и химического анализа для оценки состояния почвы в районе Кирово-Чепецкого химического комбината / С.С. Злобин, Н.О. Шулятьева, Е.В. Дабах, С.Г. и др. // Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации: сб. матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием 1-2 дек. 2010 г. – Киров: ООО «Лобань», 2010. – Вып. 8. – Ч.1. – С.193–196.

УДК 57.044; 631.4; 504.05

ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛА ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ СОЧЕТАННОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ НЕФТЬЮ И ПЕРЕМЕННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ ПРОМЫШЛЕННОЙ ЧАСТОТЫ

Мазанко М.С., Колесников С.И., Денисова Т.В.

ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

В современном мире всё шире используются нефть и нефтепродукты, а потому все чаще происходят случаи их утечки, загрязнения воды и почвы. Серьезное влияние нефтепродуктов на активность почв отмечается во многих исследованиях [4, 5]. Они подавляют активность ферментов, нарушают почвенное дыхание и нормальное протекание биологических процессов [4, 5, 6, 8, 11, 12, 13]. Так же снижается численность почвенных микроорганизмов, такие важные экологические группы бактерий, как целлюлозолитики, нитрификаторы и азотфиксаторы снижают свою активность, тем самым нарушая нормальное течение почвенных процессов [2, 3, 7].

Чаще всего химическое загрязнение почв происходит в промышленных районах, где почва дополнительно подвергается электромагнитному воздействию. Однако работ, посвященных сочетанному загрязнению почвы, очень мало.

Поэтому целью нашей работы стало изучить влияние сочетанного загрязнения почвы нефтью и переменным магнитным полем (ПемП).

Ранее нами проводились исследования по влиянию сочетанного загрязнения нефтью и электромагнитными полями высокой интенсивности на почву [9]. Интенсивность же электромагнитных полей возле линий электропередач, линий электропоездов, метро, крупных промышленных объектов обычно составляет 50-100 мкТл [10].

Нашей задачей было установить, как сочетанное загрязнение почвы нефтью и электромагнитными полями промышленной частоты и интенсивности влияет на фитотоксические свойства почвы.

Объектом исследования был чернозем обыкновенный, отобранный в Ботаническом саду г. Ростова-на-Дону (0-20см).

Почву высушивали до воздушно-сухого состояния. Затем образы почвы помещали в стеклянные сосуды и увлажняли до 60% от общей влагоёмкости. Вносили нефть в количестве 1 и 5% от общей массы почвы, после помещали в специально созданные установки, где в течение 10 суток облучали почву переменным магнитным полем промышленной частоты (50 Гц) уровнем индукции 50, 100 и 650 мкТл.

Через 10 суток почву вынимали и определяли влияние загрязнения на численность микроорганизмов методом люминесценции [1].

Полученные результаты представлены на рис. 1.

Электромагнитное загрязнение не вызывало достоверных изменений в численности почвенных микроорганизмов.

Нефтяное загрязнение в количестве 1% от массы почвы достоверно не влияло на численность почвенных микроорганизмов, однако при сочетанном загрязнении с тем же уровнем химического загрязнения нами наблюдались изменения в количестве микроорганизмов. При интенсивности переменного магнитного поля 50 мкТл количество микроорганизмов в почве возросло на 19% ($p < 0,05$), 100 мкТл – 25% ($p < 0,05$). При увеличении интенсивности переменного магнитного поля до 650 мкТл стимулирующее действие сочетанного загрязнения исчезало, численность микроорганизмов достоверно не отличалась от контрольной.

При увеличении нефтяного загрязнения до 5% от массы почвы наблюдалось возрастание численности почвенных микроорганизмов на 18% ($p < 0,05$). При сочетанном загрязнении, так же, как и в предыдущем случае, численность микроорганизмов увеличивалась на 24% ($p < 0,05$) при интенсивности переменного магнитного поля 50 мкТл и на 34% ($p < 0,05$) при интенсивности 100 мкТл. При интенсивности 650 мкТл численность микроорганизмов падала и не отличалась достоверно от контрольной.

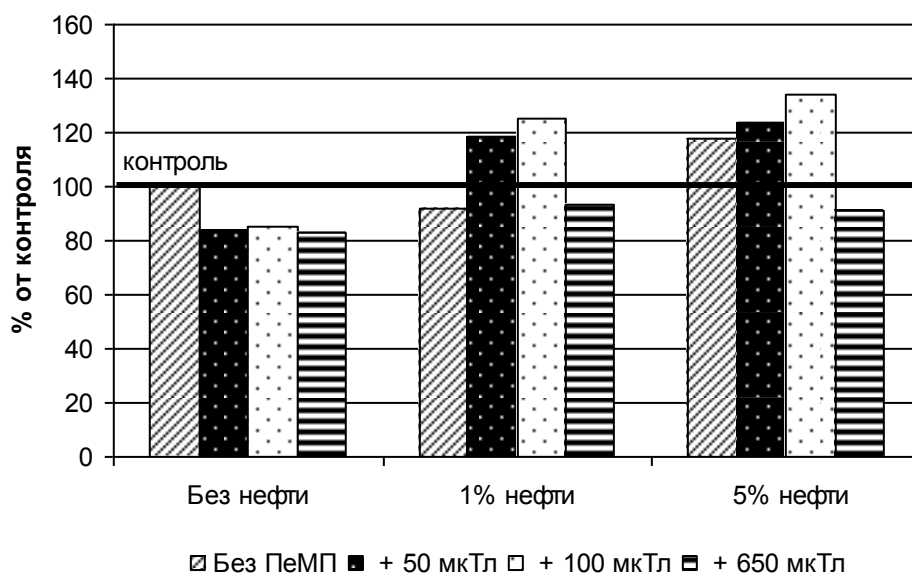


Рис. 1. Влияние сочетанного загрязнения на численность почвенных микроорганизмов.

Из приведённых выше данных можно сделать вывод, что нефтяное загрязнение способно увеличивать количество микроорганизмов в почве. Переменное магнитное поле индукцией 50 и 100 мкТл при сочетанном загрязнении так же увеличивало численность почвенных микроорганизмов, в то время как переменное магнитное поле интенсивностью 650 мкТл подобного эффекта не оказывало.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казеев К.Ш., Колесников С.И. Биодиагностика почв: методология и методы исследований. / Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ, 2012. 260 с.
2. Киреева Н.А. Биологическая активность чернозема выщелоченного, загрязненного продуктами сгорания попутного нефтяного газа, и возможности ее восстановления при фиторемедиации / Н.А. Киреева, А.А. Шамаева, А.С. Григориади, Е.И. Новоселова // Почвоведение. - 2009. - №4. - С. 498-503
3. Киреева Н.А., Галимзянова Н.Ф. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов // Почвоведение. 1995. № 2. С. 211-216.
4. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Онегова Т.С. Активность каталазы и дегидрогеназы в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Агрохимия, 2002. № 8. С. 64-72.
5. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Хазиев Ф.Х. Активность карбогидраз в нефтезагрязненных почвах // Почвоведение. 1998. № 12. С. 1444-1448.
6. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Ямалетдинова Г.Ф. Активность оксиредуктаз в нефтезагрязненных и рекультивируемых почвах // Агрохимия. 2001. №4. С. 53-59.
7. Киреева Н.А., Юмагузина Х.А., Кузяхметов Г.Г. Рост и развитие растений овса на почвах, загрязненных нефтью // С.-х. биология. 1996. № 5. С. 48-54.
8. Киреева Н.А., Ямалетдинова Г.Ф., Новоселова Е.И., Хазиев Ф.Х. Ферменты серного обмена в нефтезагрязненных почвах // Почвоведение. 2002. № 4. С. 474-480.
9. Мазанко М.С., Колесников С.И., Денисова Т.В., Кузина А.А., Вернигорова Н.А., Капралова О.А., Бабаян К.С., Лаптинова А.С. Устойчивость чернозема к сочетанному загрязнению нефтью и электромагнитным полем // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). 2013. № 07(91). <http://ej.kubagro.ru/2013/07/pdf/129.pdf>.
10. Сподобаев Ю.М., Кубанов В.П. Основы электромагнитной экологии. – М.: Радио и связь, 2000.
11. Kolesnikov, S.I., Aznaurian, D.K., Kazeev, K.S., Val'kov, V.F. Biological properties of south Russian soils: Tolerance to oil pollution // Russian Journal of Ecology Volume 41, Issue 5, 2010, Pages 398-404.
12. Kolesnikov, S.I., Petrova, N.A., Kazeev, K.S., Dadenko, E.V., Denisova, T.V., Tischenko, S.A. Biodiagnostics of sustainability of Chestnut soil to pollution with oil and heavy metals // World Applied Sciences Journal Volume 26, Issue 5, 2013, Pages 653-656.
13. Kolesnikov, S.I., Kazeev, K.Sh., Tatosyan, M.L., Val'kov, V.F. The effect of pollution with oil and oil products on the biological status of ordinary chernozems // Eurasian Soil Science Volume 39, Issue 5, May 2006, Pages 552-556.

**ЗАВИСИМОСТЬ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ
ПОЧВЕННЫХ ФАКТОРОВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДЕНАТУРИРУЮЩЕГО ГРАДИЕНТНОГО
ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДНК ГЕНОВ 16S РРНК**

Налян А.Г.¹, Ибрагимов Р.И.², Ван Клей Д.¹, Ван Клей А.¹

¹Государственный Университет им. Стивена Остина, Техас, США

²Башкирский государственный университет,

При помощи ДГГ - электрофореза было проанализировано 36 образцов ДНК выделенных из исследованных почв отобранных с 9 участков, представляющих различные типы ландшафта естественного леса в восточной части штата Техас (США). Экспериментальные участки для отбора образцов почвы и растений (размер участка 1000 м²) были подобраны в соответствии с разработанной экологической системой классификации национальных лесов западных прибрежных равнин США (Turner, 1999; Van Kley et al., 2007). Участки леса располагались в одной из трех основных типов ландшафта: умеренно-сухие возвышенности с преобладанием сосны с песчаными, глинистыми, суглинистыми почвами (ВПС); умеренно пологие склоны, днище потоков, овраги (УС) и затопляемые поймы рек (ЗП). На каждом участке были определены параметры, отражающие относительное расположение экспериментального участка РСТРОС, (угол склона, высоту над уровнем моря), а также физические и химические параметры почвы: относительное содержание глины, песка, содержание минеральных элементов (N, Mg, K, P, Ca, S), кислотность. Коэффициент РСТРОС определяли по следующей формуле: $100 \times (h_s - h_L) / (h_H - h_s)$, где h_s – высота изучаемого участка, h_L – высота самой низкой точки в радиусе 1 км, h_H – высота самой высокой точки в радиусе 1 км. В результате электрофореза максимальное количество полос (таксонов) на электрофореграмме составило 50, минимальное – 34. Дисперсионный анализ (ANOVA) показал существенные различия по числу таксонов между образцами почв различных типов ландшафта ($P = 0,0125$, на уровне 5 % значимости). Наиболее бедными по числу таксонов бактерий ($P = 0,0325$) оказались сухие песчаные почвы. Количество выявленных таксонов в этих почвах составило от 34 до 46. Результаты корреляционного анализа между параметром «число таксонов» и значениями факторов окружающей среды приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Коэффициенты корреляции и уровня значимости между экологическими переменными и богатством таксонов.

Экологические факторы	Коэффициент корреляции	Уровень значимости
топовлажность	0.50	0.006
РСТРОС	-0.45	0.014
Содержание S	0.35	0.063
Содержание P	0.35	0.064
Содержание глины	0.33	0.077
Содержание K	0.33	0.081

Из таблицы видно, что богатство таксонов (число полос на геле) существенно зависело от коэффициента РСТРОС ($P = -0,45$) и топовлажности ($P = 0,5$). Тогда

как зависимость богатства таксонов от содержания серы, фосфата, калия и глины была незначительной. Наиболее существенное влияние на видовое богатство прокариот оказывают следующие экологические факторы: тип ландшафта ($P = 0,009$), топовлажность ($P = 0,037$), РСТРОС ($P = 0,015$) и значение рН ($P = 0,002$). Эти параметры определяют 81 % дисперсии показателя видового богатства сообществ. Можно констатировать, что с повышением величины РСТРОС, число таксонов в почвах снижается, минимальное их количество обнаружено в сухих почвах возвышенностей (рис. 1).

Видовое разнообразие бактерии увеличивается с понижением кислотности почвы от рН 4,2 до 5,5. Функция зависимости видового разнообразия от топовлажности оказалась нелинейной. Можно предположить, что такая зависимость выявляется вследствие использования в модели недостаточного количества экологических параметров. Использование модели ССА показало, что наиболее важное значение для формирования структуры бактериальных сообществ имеют следующие факторы: тип ландшафта ($P = 0,021$), содержание фосфатов ($P = 0,045$) и топовлажность участка ($P = 0,061$) (рис. 2). Первая ось показывает разброс коэффициента структуры сообщества по типам ландшафта. Видно, что все изученные образцы (кроме двух из затопляемых пойм), находятся на правой стороне координат. Эти два образца перекрываются с группами образцов почв из возвышенных участков и пологих склонов, которые находятся на левой стороне графика. Вторая ось разделяет образцы по содержанию фосфатов в почве и топовлажности. Большинство образцов с нижней части ординации (-2 до 0) принадлежат сухим почвам пологих склонов и сосновых лесов (ВПС). В целом, первые две оси ССА определяют 58 % дисперсии всех данных.

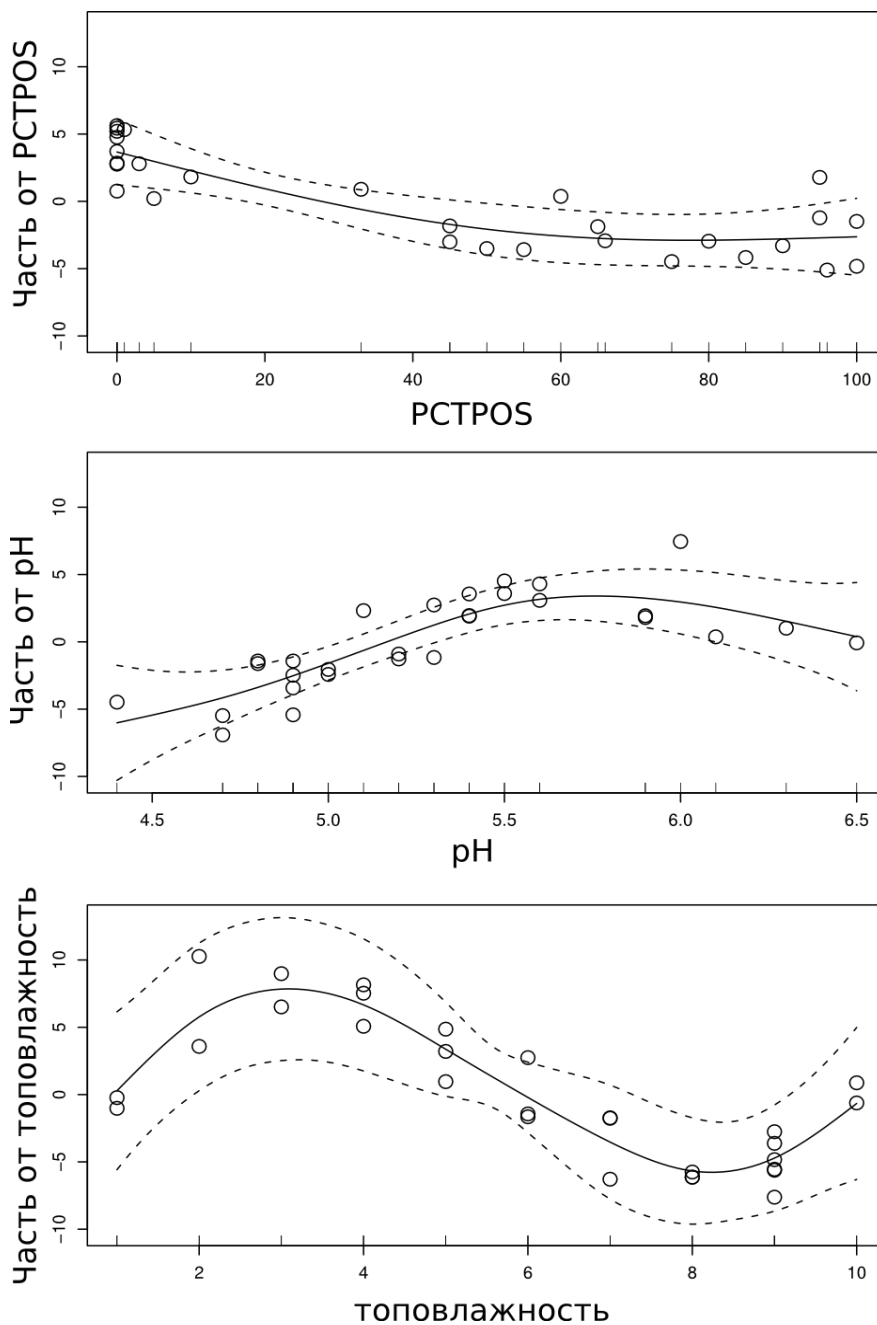


Рис. 1. Зависимость видового богатства сообществ почвенных бактерий от экологических факторов (рН, PCTPOS, топовлажность).

Примечание: По оси X- значения экологических факторов; по оси Y- доля влияния соответствующего фактора. Пунктиром показан 95 % доверительный интервал.

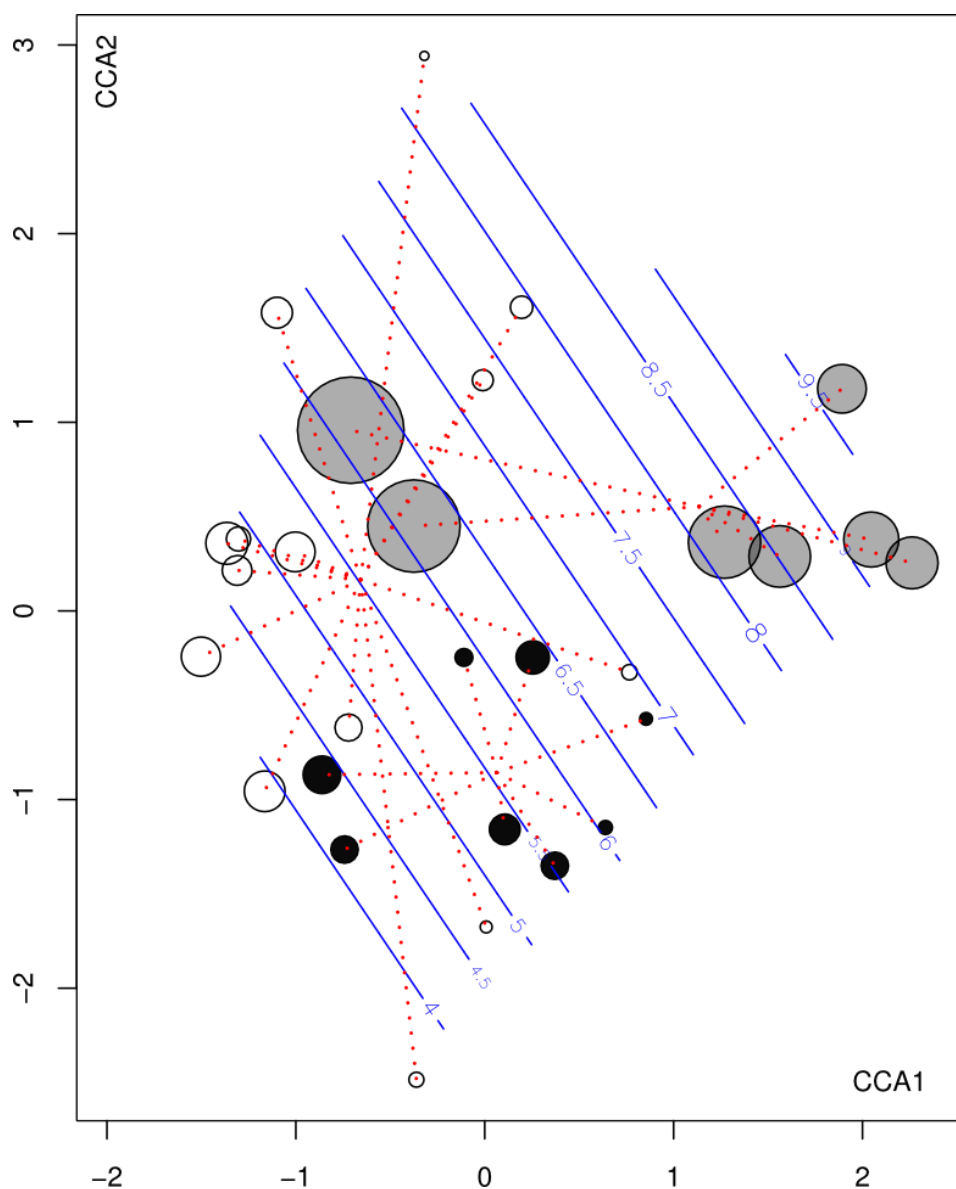


Рис. 2. Ординация результатов канонического анализа соответствий (ССА) ДГГЭ-профилей ДНК.

Примечание: Белые кружки - ВПС, серые кружки - ЗП, и черные кружки - УС. Размер символов соответствует содержанию фосфатов (1 - 20 м.д.), сплошные линии обозначают градиент топовлажности.

Предполагалось, что ДГГЭ-анализ позволяет обнаружить лишь 1 - 2 % видового состава бактериальных сообществ почв (MacNaughton et al., 1999). Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что разрешающая способность этого метода значительно выше. Так, ДГГ - электрофорезом во всех исследованных образцах почвы нами выявлено 77 уникальных таксонов бактерий, пиросеквенированием - 766 таксонов. Как видно, с помощью ДГГЭ - анализа нам удалось обнаружить около 10 % таксонов бактерий от числа таксонов, выявленных методом пиросеквенирования.

УДК 631.46

ВИДОВЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЧВЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ ДЕНДРОЛОГИЧЕСКОГО ПАРКА ЛЕСОВОДОВ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Пирогова О.С.

Вятский государственный гуманитарный университет, г. Киров, Россия

Сохранение биологического разнообразия является одной из глобальных проблем современности. Дендрологические парки являются природоохранными учреждениями и выполняют важную функцию сохранения биоразнообразия и оздоровления окружающей среды городских территорий. Дендрологический парк лесоводов Кировской области был создан в 1962 году. Дендропарк находится в Нововятском районе города Кирова и представляет собой декоративный сад, расположенный на левом берегу реки Вятки. Общая площадь парка 50,6 га, из них дендрологическая часть составляет 25 га. Здесь произрастает 111 видов различных деревьев и кустарников. В 2009 г. Дендрологический парк лесоводов приобретает статус «Памятник природы регионального значения».

Цель исследования: изучить флористический состав и количественные показатели альгофлоры некоторых экотопов Дендрологического парка лесоводов.

Пробы почв для анализа были отобраны осенью 2013 и летом 2014 годов в пяти экотопах дендропарка: на аллеях с древесными породами *Pinus sylvestris* L., *Pinus sibirica* Du Tour, *Quercus robur* L., *Populus tremula* L., *Tilia cordata* Mill, на суходольном лугу. Изучение видового состава альгофлоры проводили микроскопированием свежевзятой почвы и постановкой чашечных культур со стёклами обрастания (Штина, Голлербах, 1976). Численность определяли методом прямого микроскопирования на мазках (Домрачева, 2005).

В пробах почв парка было выявлено 53 вида почвенных водорослей и цианобактерий (рис. 1), из которых цианобактерии (ЦБ) составили 17 видов, в том числе безгетероцистных – 13 видов, гетероцистных – 4 вида; зелёные – 22 вида; жёлтозелёные – 5 видов; диатомовые – 8 видов; эустигматофитовые представлены одним видом (табл. 1).

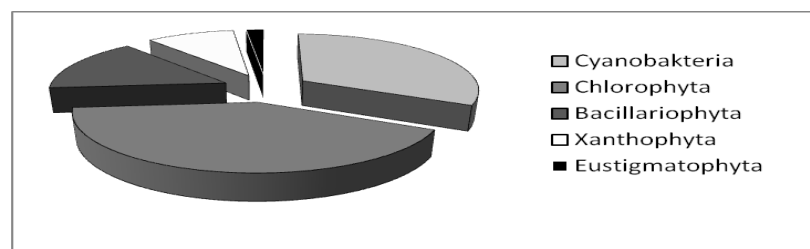


Рис. 1. Таксономический состав почвенных водорослей Дендрологического парка лесоводов г. Кирова.

Таблица 1

Число видов почвенных водорослей Дендрологического парка лесоводов

Участок	Число видов					Всего
	Cyano- bacteria	Chloro- phyta	Bacillario- phyta	Xantho- phyta	Eustigma- tophyta	
Суходольный луг	8	13	5	4	-	30
<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus sibirica</i>	4	6	3	2	1	16
<i>Populus tremula</i>	5	13	2	1	-	21
<i>Tilia cordata</i>	5	10	4	2	1	22
<i>Quercus robur</i>	7	7	5	3	1	23

Наибольшее видовое разнообразие выявлено в луговом фитоценозе – 30 видов водорослей, что составляет 56,6 % от общего видового разнообразия дендропарка. Несколько меньше видовое разнообразие в посадках лиственных пород, а наименьшие видовые показатели обнаружены в посадках *Pinus sylvestris*, *Pinus sibirica*. В летний период на всех участках Дендрологического парка лесоводов доминирующие позиции занимали представители отдела Chlorophyta, что отражает их сезонную динамику.

В осенний период в парке по видовым показателям преобладали ЦБ и диатомовые водоросли. Количественные показатели представлены в таблице 2.

Таблица 2

Количественные показатели почвенных водорослей Дендрологического парка лесоводов

Участок	Количество клеток (тыс. кл. в 1 г. почвы)			
	Cyanobacteria	Chlorophyta	Bacillariophyta	Всего
Суходольный луг	174,8±6,4	10,4±1,7	153,6±2,8	338,8±10,9
<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus sibirica</i>	68,1±3,8	5,3±6,1	75,8±5,4	149,2±15,3
<i>Quercus robur</i>	120,1±15,1	4,8±2,5	115,3±3,6	204,2±21,2
<i>Populus tremula</i>	103,4±3,6	7,3±3,3	98,4±7,2	209,1±14,1
<i>Tilia cordata</i>	91,6±7,8	3,5±4,2	93,1±6,1	188,2±18,1

По количественным показателям на суходольном лугу преобладают ЦБ, немного уступают им диатомовые водоросли. Наименьшие видовые и количественные показатели альгофлоры отмечены в посадках *Pinus sylvestris* и *Pinus sibirica*. По численности преобладают диатомовые водоросли, несколько меньше ЦБ. В посадках лиственных пород также преобладают ЦБ и диатомовые водоросли.

Доминирующие виды экотопов Дендрологического парка лесоводов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Виды-доминанты Дендрологического парка лесоводов

Экотоп	Виды-доминанты
Суходольный луг	<i>Leptolyngbya frigida, Phormidium autumnale; Chlamydomonas gloeogama, Klebsormidium flaccidum, Pseudococcomyxa simplex; Xanthonema exile, Botrydiopsis eriensis; Hantzschia amphioxys, Navicula pelliculosa</i>
<i>Pinus sylvestris, Pinus sibirica</i>	<i>Phormidium autumnale, Chlamydomonas gloeogama, Chlorella vulgaris, Coccomyxa confluens, Pleurochloris pyrenoidosa, Hantzschia amphioxys, Luticola mutica.</i>
<i>Quercus robur</i>	<i>Leptolyngbya foveolarum, Nostoc paludosum, Klebsormidium flaccidum, Pseudococcomyxa simplex, Xanthonema exile, Hantzschia amphioxys, Navicula pelliculosa</i>
<i>Populus tremula</i>	<i>Microcoleus vaginatus; Chlorococcum infusionum; Pseudococcomyxa simplex; Pleurochloris pyrenoidosa; Eustigmatos magnus; Hantzschia amphioxys; Pinnularia intermedia.</i>
<i>Tilia cordata</i>	<i>Nostoc paludosum, Actinochloris sphaerica, Klebsormidium flaccidum, Botrydiopsis eriensis, Hantzschia amphioxys.</i>

В каждой пробе были обнаружены виды: *Leptolyngbya frigida, Phormidium autumnale, Coccomyxa confluens* и *Hantzschia amphioxys*, что подтверждает их высокую встречаемость. Спектр жизненных форм почвенных водорослей и цианобактерий парка представлен формулой: P₁₃Ch₁₂C₉V₈X₆H₅. Преобладают нитчатые ЦБ, обладающие ксероморфной структурой, а также виды, толерантные к действию неблагоприятных факторов среды.

Видовой состав альгофлоры Дендрологического парка лесоводов отражает сезонную динамику. Отмечены различия видовой структуры альгофлоры в зависимости от экотопа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексахина, Т.И. Почвенные водоросли лесных биоценозов / Т.И. Алексахина, Э.А. Штина. – М.: Наука, 1984. – 148 с.
2. Домрачева, Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития / Л.И. Домрачева. – Сыктывкар.: институт Коми НЦ УрО РАН, 2005. – 336 с.
3. Штина, Э.А. Экология почвенных водорослей / Э.А. Штина, М.М. Голлербах. – М.: Наука, 1976. – 143 с.
4. Экскурсии по памятникам природы г. Кирова и области / под ред. В.В. Ширяева, И.М. Зарубиной. – Часть 1. – Киров: КОГУП «Кировская областная типография», 2006. – 164 с.

УДК 579.6:631.46:504

**ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ОПТИМИЗАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ
БИОТЕХНОЛОГИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ
АССОЦИАЦИЙ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов,
Россия

Продолжающееся загрязнение окружающей среды диктует необходимость проведения фундаментальных исследований механизмов адаптации живых организмов к условиям токсического стресса. Растительно-микробные ассоциации и грибы обладают мощным потенциалом обезвреживания поллютантов, и исследование данного феномена расширяет представление о механизмах самоочищения природы, а также служит основой для разработки эффективных биотехнологий восстановления загрязненных экосистем.

В ходе исследований, проведенных лабораторией экологической биотехнологии ИБФРМ РАН в 1997-2014 гг., получен ряд приоритетных результатов фундаментального характера, разработаны и внедрены новые методики и технологические приемы очистки объектов окружающей среды от ряда загрязнителей. Ниже приводятся основные из них.

Деструктивный потенциал ризосферных ассоциативных штаммов азоспирилл и ризобий, обладающих фитостимулирующей активностью, а также лигнинолитических базидиомицетов в отношении углеводов нефти и полициклических ароматических углеводов (ПАУ) позволяет разрабатывать на их основе эффективные фито- и микоремедиационные биотехнологии. Изученные биохимические пути и основные метаболиты бактериальной деградации исследуемых поллютантов позволяют дать заключение о возможности полной биодеградации ПАУ. Новые сведения о грибных лакказах и пероксидазах и их участии в метаболизме ПАУ отражают процессы самоочищения природы и позволяют разрабатывать научно обоснованные экологические технологии с участием высших грибов.

Внутриклеточные и экссудуруемые корнями растительные пероксиды способны детоксицировать производные ПАУ, что указывает на возможность пересечения микробного и растительного метаболизма ксенобиотиков в ризосферной зоне.

Созданные эффективные растительно-микробные ассоциации в условиях лабораторных и полевых испытаний продемонстрировали высокий фиторемедиационный потенциал в отношении углеводов нефти, пестицидов (глифосата), тяжелых металлов и мышьяка. Совместное использование грибного мицелия и почвенных микроорганизмов также проявило себя весьма перспективным способом очистки нефтезагрязненных объектов.

В результате многолетних обследований территории Саратовского нефтеперерабатывающего завода (СНПЗ) создана база данных по растениям – потенциальным фиторемедиантам (около 300). Наряду с имеющейся в институте коллекцией ризосферных штаммов-деструкторов ксенобиотиков эта база данных создает основу для развития работ по эффективной очистке загрязненных объектов.

На территории СНПЗ разработана и внедрена технология рекультивации нефтешламowych амбаров, осуществляется ежегодный мониторинг заводской площади на загрязненность нефтепродуктами и ионами тяжелых металлов, проводится фиторемедиация загрязненных участков. Совместно с Саратовским районным нефтепроводным управлением создан стационарный полигон, на котором отработана технология переработки нефтешламов и почво-грунтов с высоким содержанием нефтепродуктов методом модульного биокomпостирования.

УДК 631.41:631.46

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ В ОСНОВНЫХ ТИПАХ ПОЧВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Чугунова М.В., Бакина Л.Г., Капелькина Л.П., Герасимов А.О.

Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр
экологической безопасности РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Известно, что в процессах естественной деградации нефтяных углеводородов в загрязненных почвах ведущая роль принадлежит природным ассоциациям почвенных микроорганизмов. В почвах различных типов и биоклиматических зон данные процессы в целом подчиняются общим закономерностям. Однако динамические характеристики биodeградации нефти значительно различаются в зависимости от условий данной местности и свойств конкретной почвы.

По территории Ленинградской области проходит Балтийская трубопроводная система, часть которой эксплуатируется более 20 лет. Как показывает практика, обеспечить абсолютную безопасность эксплуатации действующих нефтяных трубопроводов практически невозможно, поэтому приходится признать неизбежным загрязнение почв нефтью при ее транспортировке. Между тем, вопрос об особенностях самоочищения почв данного региона от нефтяного загрязнения до сих пор практически не изучен.

В связи с этим целью наших исследований было изучение в условиях многолетнего полевого эксперимента направленности и динамики процессов естественной микробной деградации нефти в почвах трех типов, наиболее характерных для подзоны южной тайги Северо-Запада Российской Федерации.

Объектами исследования были: подзолистый иллювиально-железистый песчаный подзол, выбранный в качестве наиболее уязвимой в экологическом отношении почвы; окультуренная дерново-подзолистая суглинистая почва (выбрана как пример наиболее устойчивой почвы); органогенная торфяно-болотная олиготрофная почва.

В пределах выбранных экосистем в натуральных условиях на опытных площадках был произведен разлив сырой нефти в следующих дозах (л/м²): дерново-подзолистая почва: 0,7; 1,4; 4,0; 10,0; песчаный подзол: 0,6; 1,2; 3,5; 8,5; торфяно-болотная почва: 0,3; 0,6; 1,2; 1,8; 3,0. Контролем служили чистые (не загрязненные нефтью) почвы. Опыты были заложены в 4-кратной повторности, площадь делянки – 1 м². Образцы почвы для

анализов отбирали в начале и конце вегетационного сезона (июнь и октябрь) с глубины 0-10 см. Первый отбор проб был осуществлен спустя 2 недели после загрязнения и улетучивания основной массы легких фракций нефти. Длительность исследований составляла 5 вегетационных сезонов.

Известно, что количество выделяющегося из нефтезагрязненной почвы углекислого газа характеризует интенсивность процесса минерализации и максимальной утилизации энергии углеводов микроорганизмами [1]. Поэтому для количественной оценки процессов микробной деструкции нефти в исследованных почвах нами была выбрана интенсивность выделения почвой CO_2 , т.н. почвенное дыхание. Данный показатель определяли в контролируемых лабораторных условиях адсорбционным методом [2]. Общее количество нефтепродуктов в почвенных образцах всех сроков наблюдения определяли методом инфракрасной спектрометрии. Результаты изучения динамики содержания нефтепродуктов в исследованных почвах приводятся в работе Л.Г.Бакиной [3].

Результаты полевого эксперимента были следующими.

Дерново-подзолистая почва. Исследования, проведенные через 14 дней после загрязнения почвы, показали, что в диапазоне концентраций от 0,7 до 4,0 л/м² нефть не оказывала существенного влияния на микробную активность и лишь максимальная для нашего опыта доза нефти снижала ее в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 1).

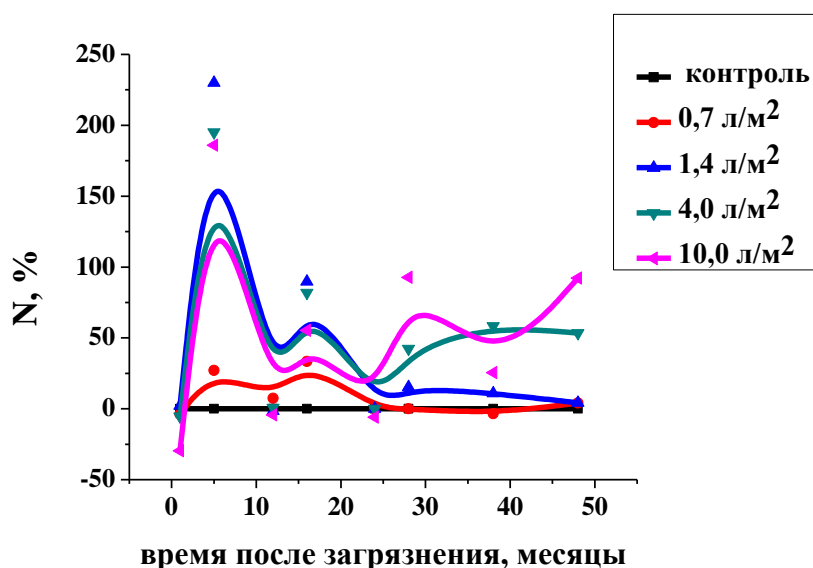


Рис. 1. Степень изменения (N) дыхательной активности нефтезагрязненной дерново-подзолистой почвы по сравнению с контролем.

Через четыре месяца после начала эксперимента реакция микрофлоры на нефтезагрязнение меняется: был зафиксирован резкий рост эмиссии CO_2 при всех дозах нефти, что свидетельствовало о бурном развитии резистентных к данным количествам нефти форм микроорганизмов и о высокой эффективности процессов биодegradации нефтяных углеводов. Повышенная, по сравнению с контролем, интенсивность этого процесса сохранялась в течение трех вегетационных сезонов, а при дозах нефти 4 и 10 л/м² – на протяжении всего опыта.

Результаты определения дыхательной активности дерново-подзолистой почвы совпали с данными по динамике содержания в ней нефтепродуктов. Было установлено, что наиболее интенсивно снижение концентрации нефтепродуктов в загрязненных образцах также происходило в течение 3-х вегетационных сезонов.

Песчаный подзол. Микроорганизмы песчаного подзола по сравнению с микрофлорой дерново-подзолистой почвы оказались гораздо более чувствительными к ингибирующему воздействию нефтяного загрязнения. Через 14 дней после начала эксперимента во всех нефтезагрязненных вариантах эмиссия углекислоты была ниже, чем в контроле. Токсичность нефти возрастала с увеличением ее дозы (рис. 2).

Со временем микробное сообщество песчаного подзола смогло адаптироваться к нефтяному загрязнению, однако скорость его адаптации снижалась по мере роста загрязненности. Так, при невысоких дозах нефти (0,6-1,2 л/м²) микрофлора достигала пика своей активности, превышающего уровень контроля, уже через 4 месяца после начала эксперимента, а при повышенном уровне загрязнения (3,5-8,5 л/м²) – только в конце 3-го вегетационного сезона.

Результаты изучения динамики дыхательной активности подзола так же, как и дерново-подзолистой почвы, совпадали с данными общего содержания нефтепродуктов. Было установлено, что при низком уровне загрязнения (0,6-1,2 л/м²) содержание нефти в песчаном подзоле наиболее интенсивно снижалось в первые два вегетационных сезона эксперимента, т.е. в период ее повышенной дыхательной активности. Заметное снижение содержания нефтепродуктов в почве, загрязненной повышенными дозами нефти (3,5-8,5 л/м²), началось значительно позднее – в конце третьего вегетационного сезона, что по времени также совпало с ростом эмиссии CO₂.

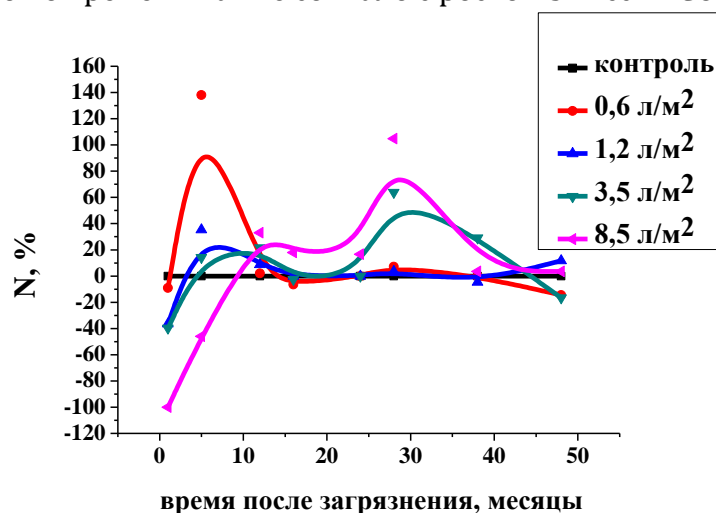


Рис. 2. Степень изменения (N) дыхательной активности нефтезагрязненного песчаного подзола по сравнению с контролем.

Установленная для минеральных почв взаимосвязь снижения содержания нефтепродуктов с ростом эмиссии углекислого газа свидетельствует о микробном характере деструкции нефти. Наиболее интенсивно снижение концентрации нефтепродуктов в минеральных почвах происходило в первые три вегетационных сезона опыта. В дальнейшем скорость разложения нефти падала при всех уровнях загрязнения.

Торфяно-болотная почва. В ряду изученных почв болотная почва отличалась наименее устойчивыми к токсическому действию нефти микробными сообществами: дыхание почвы в первые 3 вегетационных сезона опыта было значительно подавлено при всех уровнях загрязнения (рис. 3).

Полное восстановление дыхания и его дальнейшее значительное превышение над контрольным уровнем произошло в конце 4-го вегетационного сезона лишь в почве с невысокими дозами нефти (0,3 и 0,6 л/м²). В этот же период времени в данной почве была зафиксирована максимальная скорость разложения углеводов. Это

свидетельствует об активной утилизации нефти в слабозагрязненных почвах нефтеокисляющими микроорганизмами.

Дыхание торфяно-болотной почвы с повышенными дозами нефти, 1,8 и 3,0 л/м², на протяжении всего опыта оставалась значительно ниже, чем в чистой почве. Вероятно, высокая чувствительность микроорганизмов болотной почвы к нефтяному загрязнению, объясняется ее переувлажнением. Болотные воды практически стояли на поверхности почвы, а нефть, внесенная в повышенных дозах, образовывала на воде пленку. Со временем эта пленка превращалась в корку. Известно, что одним из важнейших факторов, лимитирующих биохимические процессы, связанные с потреблением кислорода, является воздушный режим почвы. Образовавшаяся на поверхности торфяно-болотной почвы нефтяная корка препятствовала проникновению кислорода в верхний почвенный слой, затрудняла газообмен, в результате чего активность аэробных биохимических процессов снижалась. На фоне низкой дыхательной активности микрофлоры общее количество нефтепродуктов в вариантах с повышенным содержанием нефти сократилось в среднем на 72,5%. Можно предположить, что в этих почвах происходила не аэробная биодеструкция углеводородов нефти до углекислого газа и воды, а их трансформация в результате абиотических процессов, а также деятельности анаэробной микрофлоры.

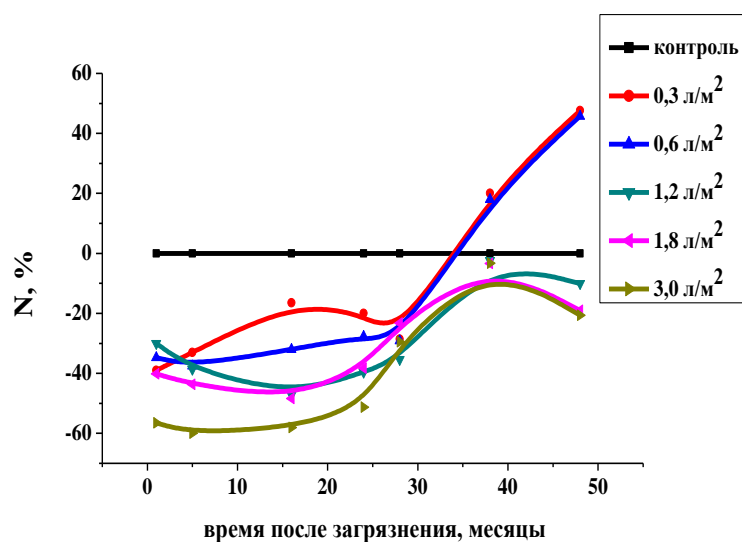


Рис. 3. Степень изменения (N) дыхательной активности нефтезагрязненной торфяно-болотной почвы по сравнению с контролем.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать следующие выводы:

1. Исследованные нефтезагрязненные почвы в значительной степени отличались по скорости и механизмам естественной деградации нефтяных углеводородов.

2. Из минеральных почв дерново-подзолистая почва оказалась наиболее устойчивой к токсическому действию нефтезагрязнения и характеризовалась активным протеканием процессов биодеструкции нефти при изученных дозах загрязнения. Песчаный подзол характеризовался гораздо менее активным разложением нефти.

3. Уменьшение содержания нефтепродуктов в минеральных почвах было обусловлено активностью аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов. Наиболее интенсивно снижение концентрации нефтепродуктов в загрязненных минеральных поч-

вах происходило при высоких дозах загрязнения в течение трех первых вегетационных сезонах.

4. В ряду изученных почв органогенная торфяно-болотная почва отличалась наименее устойчивыми к токсическому действию нефти микробными сообществами. Активная утилизация нефти аэробными микроорганизмами была зафиксирована лишь в слабозагрязненных почвах в конце четвертого вегетационного сезона. В почвах с повышенным содержанием нефти, по всей видимости, происходила не аэробная биодеструкция углеводов до углекислого газа и воды, а их трансформация в результате абиотических процессов, а также деятельности анаэробной микрофлоры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Новоселова Е.И. и др. Микробиологическая рекультивация нефтезагрязненных почв. М.: ОАО «ВНИИОЭНГ», 2001. – 40 с.
2. Головкин Э.А. О методах изучения биологической активности торфяных почв// Микробиологические и биохимические исследования почв: Мат. научной конференции. Киев: Урожай, 1971. – С. 68-71.
3. Бакина Л.Г. Роль фракций гумусовых веществ в почвенно-экологических процессах// Автореф. дисс. докт. биол. наук. СПб, 2012. – 50 с.

УДК 631

ОЦЕНКА МЕТОДОВ РЕКУЛЬТИВАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ПО СВОДНЫМ ИНДЕКСАМ

Щемелинина Т.Н., Анчугова Е.М, Маркарова М.Ю., Мелехина Е.Н.

ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г.
Сыктывкар, Россия

Для европейского Севера России значима проблема нефтяных загрязнений, оказывающих негативное воздействие на природные сообщества. Мониторинг нарушенных экосистем по различным показателям позволяет разработать систему индикаторных параметров для оценки эффективности применяемых методов рекультивации в данных конкретных условиях.

Комплексный мониторинг проводился на опытном участке № 20 на территории Пермокарбонского месторождения Усинского района Республики Коми. Почвы участка торфяные. Разлив нефти произошел в 1996 г. В 2002 году при участии российских и зарубежных исследователей был заложен полевой промышленный опыт по оценке эффективности биопрепаратов и агроприемов для очищения почв от нефти в условиях Севера.

Нами обследованы площадка применения биопрепарата «Универсал» (автор Маркарова М.Ю.), разработанного на основе нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из загрязненных почв месторождений Республики Коми, а также площадка

применения биопрепарата «Родер», состоящего из штаммов-деструкторов нефти из рода *Rhodococcus*. При внесении в почву биопрепаратов производилось одновременное внесение комплексных минеральных удобрений, а также фрезерование почвы на глубину 20 см. Применение агрохимических методов основано на внесении в почву минеральных удобрений и доломитовой муки под фрезу.

Анализ огромного комплекса полученных данных довольно сложен, поэтому нами была принята попытка оценить состояние нефтезагрязненной почвы на участках при помощи различных сводных индексов.

При оценке качества почвы по химическим параметрам рекомендуется использовать данные о компонентах подвижной фракции нефти, таких как *n*-алканы и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). О модели распределения алкановой фракции свидетельствует значение индекса CPI – carbon preference index (в общем виде соотношение нечетных *n*-алканов к четным) [1]. При оценках загрязнения компонентов экосистем ПАУ рекомендуется применять индекс «техногенности» – соотношение суммы пирена с флуорантеном (преимущественно техногенного происхождения) к сумме хризена с фенантеном (природного генезиса) [2].

Распределение *n*-алканов в почвах дернового горизонта участков относится к типичной биогенной модели с «пилообразным» распределением в области C21 – C31. Преобладание «нечетных» углеводородов свойственно для водорослей, воска кутикулы высших растений. Увеличение значений индекса CPI, который является математическим выражением модели распределения, свидетельствует о значительном снижении доли *n*-алканов C14 – C18 петрогенного происхождения. Таким образом, на участках с высоким проективным покрытием злаками более активно протекали процессы биологического разложения нефти с участием как микроорганизмов, внесенных в субстрат с биопрепаратами, так и самих зеленых растений. Однако, показатели индекса существенно отличаются от такового для почвы фонового участка.

10 –

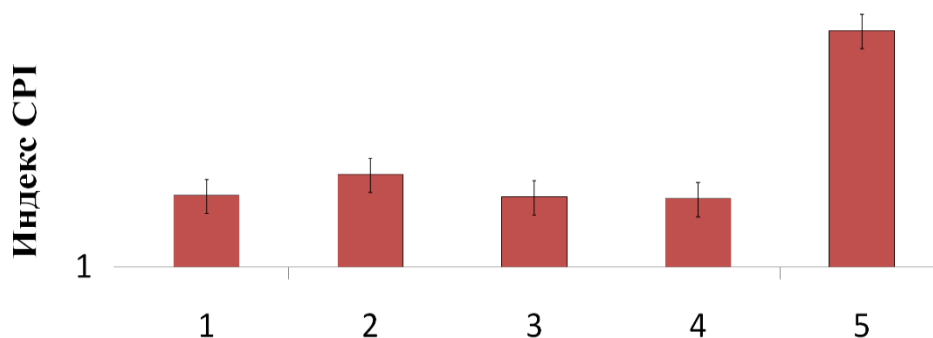


Рис. 1. Значения индекса CPI в почве: 1 – Контроль; 2 – Универсал; 3 – Агрохимические методы; 4 – Родер; 5 – фон.

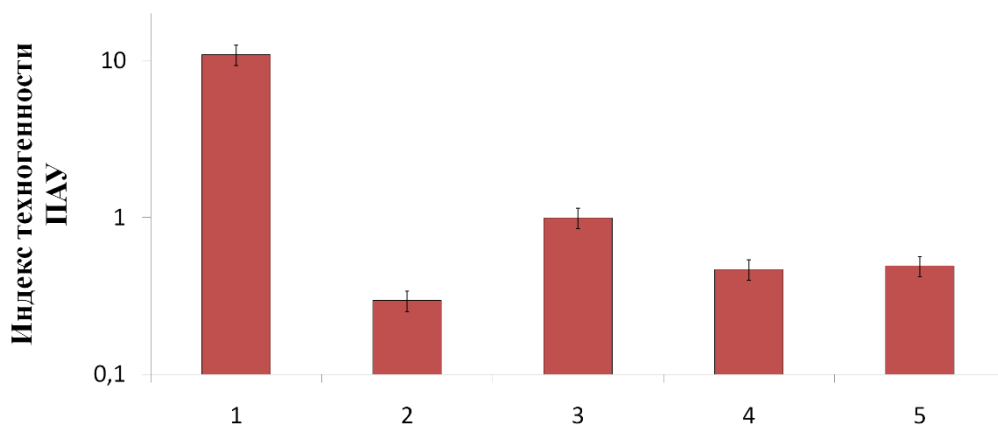
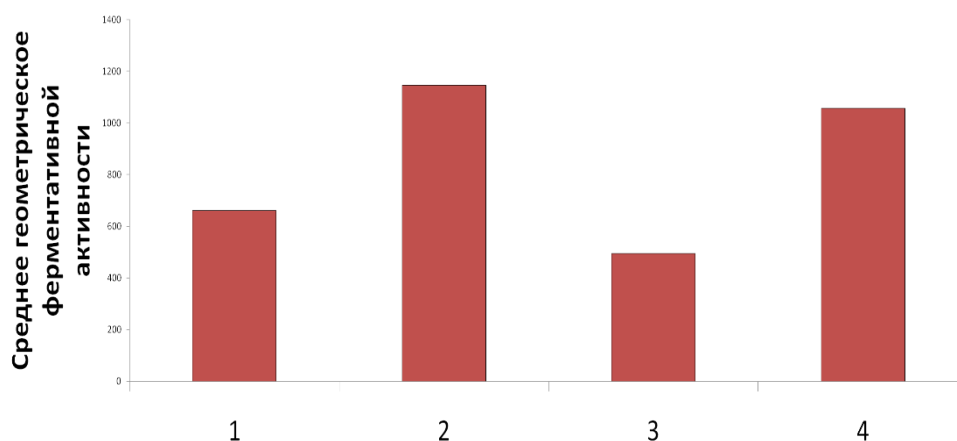


Рис. 2. Значения индекса «техногенности» ПАУ: 1 – Контроль; 2 – Универсал; 3 – Агрехимические методы; 4 – Родер; 5 – фон.

При оценках состояния загрязненности ПАУ рекомендуется применять индекс техногенности ПАУ – соотношение между углеводородами антропогенного (и природного генезиса). К полиаренам геохимического фона относят фенантрен и хризен. Однако, список канцерогенных полиаренов не исчерпывается пиреном и флуорантеном, он также включает и иные высокомолекулярные ПАУ: бенз[к]флуорантен, бенз[а]пирен, дибенз[а,г]антрацен, бенз[g,h,i]перилен, количество которых резко возрастает в почвах, рекультивируемых биопрепаратами на бактериальной основе.

Все показатели ферментативной активности были сведены к расчету среднего геометрического (GMea), который объясняет тенденции изменения качества почвы без измерения физических параметров [3].

По значениям среднего геометрического ферментативной активности можно судить о влиянии различных технологий, применяемых для очистки почв от нефтепродуктов. Как видно из диаграммы, внесение биопрепаратов увеличивает значение GMea по сравнению с нефтезагрязненной необработанной почвой (Контроль), что говорит о положительном эффекте проведенных биоремедиационных мероприятий. Применение только агрохимических методов не приводит к усилению биохимических процессов в загрязненной нефтью почве, а значит, и процессы восстановления будут происходить значительно дольше, чем при внесении биодобавок.



Создание концепции диагностики состояния нефтезагрязненных рекультивируемых почв с применением информативных и мало затратных способов оценки должно способствовать усовершенствованию разработанных применяемых методов рекультивации почв.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-4-4-014-АРКТИКА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gao, Y.C. Assessing the quality of oil-contaminated saline soil using two composite indices / Y.C. Gao, J. Wang, J. Xu, X. Kong, L. Zhao, D.H. Zeng // *Ecological Indicators*. – 2013. – Vol. 24. – P. 105 – 112.
2. Bray, E.E. Hydrocarbons in nonreservoir rock source beds: Part 1 / E.E. Bray, E.D. Evans // *AAPG Bulletin*. – 1965, No. 49. – P. 248 – 257.
3. Ровинский, М.Я. Фоновый мониторинг полициклических ароматических углеводородов / М.Я. Ровинский, Т.А. Теплицкая, Т.А. Алексеева. – Л.: Гидрометеиздат, 1988. – 224 с.

**СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ**

УДК 581.1:571.175.14

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНИНПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗАГУЩЕННЫХ ПОСЕВОВ РАСТЕНИЙ САЛАТА

Архипова Т.Н., Кудоярова Г.Р., Мартыненко Е.В., Высоцкая Л.Б.

Институт биологии УНЦ РАН, г.Уфа, Россия

Рост населения земного шара требует постоянного увеличения объема продовольствия. Вместе с тем, один из источников расширения производства сельскохозяйственной продукции, т.е. увеличение посевных площадей, к настоящему времени исчерпан, и, наоборот, повсеместно происходит их сокращение из-за повышения аридности климата и техногенных воздействий. В этих условиях особую важность приобретает возможность увеличения урожая с единицы посевной площади за счет большей плотности посева растений. Однако, загущение посева сопровождается отрицательными для продуктивности последствиями, например, снижением площади листьев, что сказывается на их способности к фотосинтезу, а также уменьшением степени ветвления побега и ускорением старения [1]. По некоторым данным, отрицательные последствия повышенной плотности посева связаны не столько с дефицитом ресурсов, сколько с восприятием растениями внешних сигналов о присутствии соседей [2]. В литературе есть сведения о роли этиленового сигналинга в конкуренции растений. Возможному участию других гормонов в реакции растений на присутствие соседей уделялось мало внимания. Между тем, известно, что фитогормоны цитокинины регулируют именно те процессы (рост листьев, ветвление, старение) [3], на которых отрицательно сказывается конкуренция между растениями. Ранее нами была выявлена способность некоторых видов почвенных бактерий продуцировать цитокинины, а также изучено влияние их инокуляции в ризосферу на рост и развитие растений [4, 5]. В данной работе было изучено влияние инокуляции на рост растений салата в присутствии и отсутствии конкурентов.

Растения салата проращивали в чашках Петри, 3-х суточные проростки пересаживали по 5 штук в сосуды с 0.2 кг стерильного песка, пропитанного 100%-ным раствором Х-А. 14-и суточные растения (три сформированных листа) вновь пересаживали по 1, 2 и 3 растения в одном сосуде с 0.2 кг песка. Растения салата выращивали на светоплощадке с 14 часовым фотопериодом, температурой 22-26°C днем и 18-20°C ночью, освещенностью 420 мкмоль м⁻² с⁻¹ ФАР. Через 2 дня после последнего пересаживания растений (на 16 сутки выращивания) в ризосферу (под корень) вносили по 3 мл суспензии клеток штамма *B. subtilis* ИБ-22 из коллекции почвенных микроорганизмов Института биологии Уфимского научного центра РАН. Штамм характеризуется высокой продукцией цитокининов [5]. Площадь листьев растений салата и табака измеряли через 12 суток после пересадки растений в сосуды при помощи прибора автоматического определения площади Li-3100 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Определение транспирации проводили гравиметрически по потере веса вегетационным сосудом, который предварительно закрывали фольгой для предотвращения потери воды с поверхности песка.

Измерение площади листьев показало (рис. 1), что присутствие соседей отрицательно сказывалось на их росте: площадь листьев каждого из двух растений, посаженных в один сосуд, была на 20 %, а каждого из трех – на 30 % меньше, чем у одиночных

растений. Таким образом, конкуренция снижала скорость роста листьев. Внесение цитокининпродуцирующих бактерий в ризосферу растений стимулировало их рост и приводило к увеличению площади листьев, что соответствует ранее полученным данным о способности этих бактерий стимулировать рост растений салата [5]. Однако в предыдущих опытах при инокуляции не учитывалась плотность посева растений, и поэтому полученные нами результаты представляют интерес.

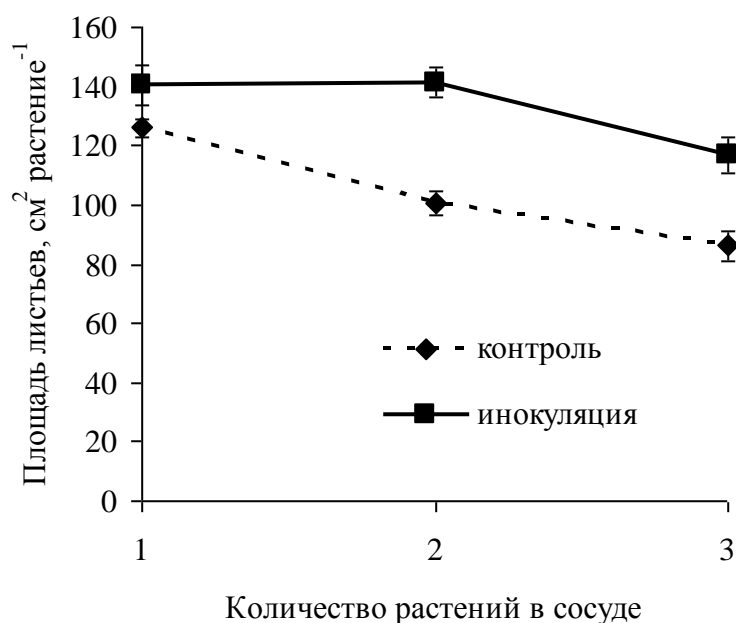


Рис. 1. Влияние присутствия соседей и инокуляции на площадь листьев растений салата.

Из рисунка 1 видно, что на фоне инокуляции по площади листьев каждое из двух растений салата не отличалось от одиночных растений, что указывает на нивелирование ингибирующего действия соседей на рост в присутствии цитокининпродуцирующих бактерий. Увеличение плотности посадки до трех растений в одном сосуде все же снижало площадь листьев, но она была лишь на 20 % меньше, чем у одиночных растений, в то время как в отсутствие инокуляции снижение составило 30 %. Таким образом, и при более высокой плотности посадки, инокуляция снижала степень ингибирования роста под влиянием соседей. Ростстимулирующее действие бактерий лучше проявлялось на фоне конкуренции. Так если у одиночных растений инокуляция повышала площадь листьев только на 10 % по сравнению с неинокулированными растениями, то у растений, посаженных по двое и трое в сосуд стимуляция была на уровне 35-40%.

Представляло интерес попытаться выяснить механизм снижения скорости роста под влиянием соседей и его нивелирования в результате инокуляции цитокининпродуцирующих бактерий. Ранее было показано, что присутствие соседей приводит к снижению устьичной проводимости и транспирации [6]. Как видно из рисунка 2, этот эффект проявлялся и в наших опытах. Присутствие соседей снижало скорость потери воды растениями, что указывает на закрытие устьиц. Как известно, закрытие устьиц нарушает газообмен и фотосинтез, что должно отрицательно сказаться на росте. Цитокинины могут способствовать поддержанию устьиц в открытом состоянии [6], однако этот эффект не проявлялся в данных опытах, и по скорости транспирации инокулиро-

ванные растения не отличались от неинокулированных. Очевидно цитокинины, продуцируемые бактериями, как-то иначе, а не через открытие устьиц, влияли на рост растений.

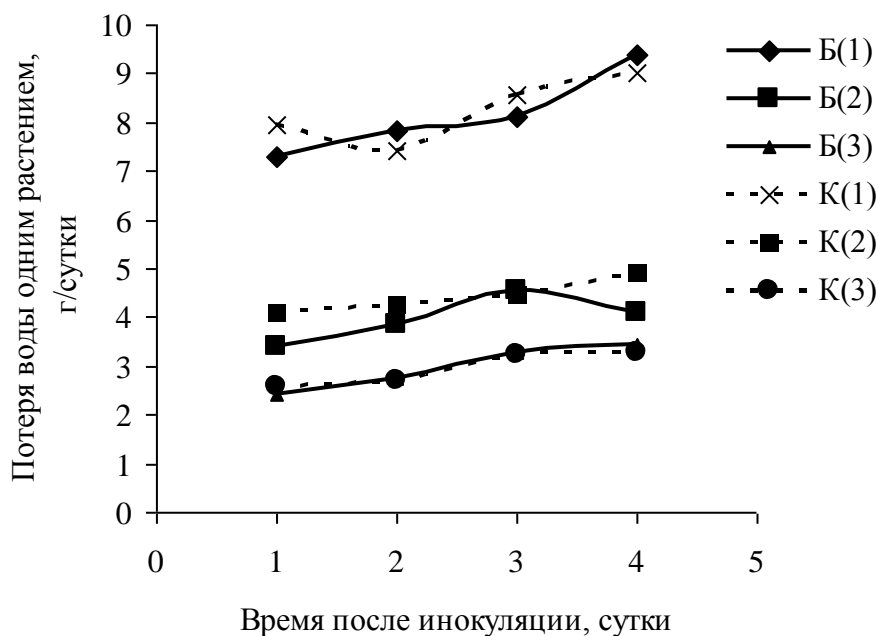


Рис. 2. Транспирация инокулированных (Б) и неинокулированных (К) растений, которые росли по одному (1), по два (2) и три (3) в сосуде.

Известно, что цитокинины могут напрямую действовать на процессы деления и растяжения листьев, активируя тем самым их рост [1]. Этим, по-видимому, и можно объяснить тот факт, что обработка растений салата цитокининпродуцирующими микроорганизмами не только стимулировала их рост, но и уменьшала степень ингибирующего действия соседей. Фитогормоны присутствуют в почвенном растворе, поглощаются растениями и оказывают влияние на их рост [5]. Очевидно, что с увеличением плотности посева растения начинают конкурировать между собой за содержащиеся в почве гормоны. Инокуляция в ризосферу бактерий, отличающихся повышенной способностью к синтезу цитокининов, очевидно, снижает дефицит цитокининов в почвенном растворе при повышении плотности посева.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что введение цитокининпродуцирующих бактерий в ризосферу растений может снизить отрицательные последствия загущенности посевов.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-00775А

ЛИТЕРАТУРА

1. Voccalandro H., Ploschuk E.L., Yanovsky M.J., Sanchez R.A., Gatz C., Casal J.J. Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops // *Plant Physiology*. 2003. V. 133. P. 1539–1546.
2. Pierik R., Sasidharan R., Voeselek L.A.C.J. Growth control by ethylene: adjusting phenotypes to the environment // *J. Plant Growth Regul.* 2007. V. 26. № 1. P. 188–200.

3. Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р., Фархутдинов Р.Г. Гормоны растений. Регуляция концентрации и связь с ростом и водным обменом. М: Наука. - 2007. 157 с.
4. Wilkinson S., Davies W.J., Kudoyarova G.R., Veselov D.S., Arkhipova T.N Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management // J. Exp. Botany. 2012. V. 63. P. 3499-3509.
5. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние цитокининпродуцирующих микроорганизмов на рост растений салата при различном уровне их водообеспеченности // Агрехимия. 2003. № 5. С. 36-41.
6. Vysotskaya L.B., Kudoyarova G.R., Veselov S., Jones H.G. Unusual stomatal behaviour on partial root excision in wheat seedlings // Plant, Cell and Environment. 2004. V. 27. P. 69-77.

УДК 632.937.15

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ ОПЫТНЫХ ОБРАЗЦОВ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА

**Асатурова А.М., Жевнова Н.А, Томашевич Н.С., Хомяк А.И., Дубяга В.М.,
Павлова М.Д., Козицын А.Е.**

Всероссийский научно-исследовательский биологической защиты растений
г. Краснодар, Россия

Введение. Применение современных химических пестицидов и в том числе фунгицидов, имеет огромные масштабы. Это обострило экологические проблемы, так как высокая стойкость пестицидов, неспецифичность их действия и накопление в окружающей среде токсических остатков неизбежно приводит к глубоким изменениям в экосистемах: формированию устойчивых рас возбудителей болезней; уменьшению численности полезных членов микробиоты природных биоценозов; снижению биологической активности почвы. При этом, в условиях сложной фитосанитарной ситуации на посевах сельскохозяйственных культур, значительной пораженности посевного и посадочного материала и инфицированности пахотных земель фитопатогенными микроорганизмами полный отказ от использования средств защиты растений и агрохимикатов невозможен [1].

В связи с этим особое значение приобретает использование экологически безопасных приемов защиты растений от возбудителей болезней. Достигнутый к настоящему времени уровень биологизации растениеводства варьирует в отдельных странах от 1,5-2,0 (США) до 9,0-10,0 % (Швеция) [2]. Отставание России в области биологической защиты растений от развитых стран, по мнению исследователей, очевидно, что связано, в том числе с отсутствием современных стандартов и биотехнологий получения биопестицидов. Поэтому разработка новых биотехнологий получения и применения современных конкурентоспособных микробных препаратов для сельского хозяйства становится одной из актуальных задач [3-5].

Северный Кавказ является зоной широкого возделывания озимой пшеницы, которой ежегодно засеивается 3,5-4,5 млн. га, что обеспечивает до 20 % валового сбора зерна в России. Эта культура подвержена воздействию большого комплекса фитопатогенов, среди которых возбудители фузариоза, приводящие к прямым потерям урожая до 30-40 %, потерям качества зерна – до 100 % [6].

Массовым эпифитотиям этого заболевания и переходу гриба от преимущественно сапротрофного типа питания к паразитическому способствует группа факторов, присущих интенсивной технологии. В их числе – не только применение химических протравителей и фунгицидов, но и поверхностная предпосевная обработка почвы, избыточное внесение азотных удобрений, ретардантов и т.д. Наблюдается тенденция к увеличению доли пораженных растений как в фазе всходов, так и в фазе созревания, что свидетельствует о неблагоприятной экологической обстановке в агроценозах России.

Проблемы биотехнологий получения новых экологически безопасных биоpestицидов для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза являются актуальными для лидеров в производстве озимой пшеницы: Китая, Индии, США, Канады и, конечно, для России как одного из основных производителей и экспортеров данной культуры в мире.

В связи с этим, целью нашей работы было определить эффективность применения опытных образцов биопрепаратов на основе новых штаммов бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза в лабораторных и полевых условиях.

Материалы и методы.

Объектом исследований служили штаммы бактерий-антагонистов возбудителей фузариоза *B.subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 тест-культуры фитопатогенных грибов: *Fusarium graminearum* Schwabe из рабочей коллекции ГНУ ВНИИБЗР Россельхозакадемии, семена и проростки озимой пшеницы сорта Батько.

В опытах при определении биологической эффективности в качестве тест-культуры использовали семена озимой пшеницы сорта Батько, восприимчивого к корневым гнилям.

Оценку защитного действия опытных образцов в лабораторных опытах осуществляли на фоне искусственного заражения *Fusarium graminearum* Schwabe в условиях климатической камеры роста растений Binder KWWF 720.

Степень развития болезни на проростках пшеницы учитывали по четырехбалльной шкале [7-9], где

- 0 – отсутствие больных проростков,
- 1 – слабое проявление (до 25 % пораженной поверхности корней),
- 2 – среднее проявление (до 50 % пораженной поверхности корней),
- 3 – сильное проявление (до 75 % пораженной поверхности корней),
- 4 – очень сильное проявление или гибель растения.

Распространенность болезни рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{n}{N} \times 100, \text{ где}$$

- P – распространенность болезни, %;
- n – число больных растений в варианте;
- N – общее число растений в варианте.

По результатам балльной оценки пораженных растений определяли развитие болезни:

$$R = \frac{\sum(a \times b) \times 100}{N \times K}, \text{ где}$$

R – развитие болезни, %;

a – количество растений с одинаковым баллом поражения (b);

Σ – сумма произведений $a \times b$;

N – общее число растений в варианте;

K – высший балл шкалы учета.

Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота:

$$C = \frac{100 \times (P - p)}{P}, \text{ где}$$

C – биологическая эффективность, %;

P – развитие болезни в контроле, %;

p – развитие болезни в обработанном варианте, %.

Результаты и обсуждение.

В ходе лабораторных тестов установлено положительное влияние опытных образцов биопрепаратов на всхожесть семян озимой пшеницы. Так всхожесть семян в вариантах со штаммами *B. subtilis* BZR 517 и *B. subtilis* BZR 336g составила 95.0 и 96.7 % соответственно, что превышало данный показатель в контроле – 91.7 %.

Учет поражения корневыми гнилями фузариозной этиологии показал, что в контрольном варианте развитие болезни составило 20.1 %, а распространение – 75.4 %. Установлено, что предпосевная обработка семян опытными образцами новых биопрепаратов обеспечивала биологическую эффективность 71.9 % в варианте с *B. subtilis* BZR 336g и 78.3 % в варианте с *B. subtilis* BZR 517, при эффективности биологического эталона Фитоспорин-М, Ж и химического эталона Кинто Дуо, КС 40.8 % и 70.8 % соответственно.

Эффективность применения опытных образцов биопрепаратов на основе перспективных штаммов бактерий-антагонистов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на фоне естественного поражения фузариозом озимой пшеницы сорта Калым определялась в условиях стационарного севооборота ВНИИБЗР в 2012-2013 гг. В качестве эталона испытывали вариант с предпосевной обработкой семян препаратом Раксил, КС (0.5 л/т).

В фазу выхода в трубку осуществляли отбор растений для изучения влияния испытываемых препаратов на рост и развитие растений озимой пшеницы. Установлено, что опытные образцы биопрепаратов в условиях полевого эксперимента стимулируют рост и развитие растений озимой пшеницы. Отмечено увеличение длины побега растений озимой пшеницы на 7.5 % и 8.3 %, массы побега – на 57.3 % и 21.8 % по вариантам опыта *B. subtilis* BZR 517 и *B. subtilis* BZR 336g соответственно. В варианте с препаратом Раксил, КС было отмечено увеличение массы побега на 20.9%, увеличение длины побега отмечено не было.

На фоне поражения фузариозом 14.3 % биологическая эффективность обработки семян и вегетирующих растений опытными образцами биопрепаратов на основе

штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 составила 9.8 и 43.4 % соответственно, при эффективности эталона Раксил – 44.1 % (табл. 1).

Таблица 1.

Эффективность обработки семян и вегетирующих растений озимой пшеницы сорта Калым опытными образцами биопрепаратов против возбудителей фузариоза в полевых условиях.

Вариант	R, %	Биологическая эффективность, %	Урожайность, ц/га	Дополнительный урожай	
				ц/га	%
Контроль	14.3	–	33.8	-	-
Раксил, КС, эталон	8.0	44.1	38.5	4.7	13.9
<i>B. subtilis</i> BZR 517	8.1	43.4	42.2	8.4	24.9
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	12.9	9.8	50.0	16.2	47.9

Максимальная дополнительная урожайность в размере 8.4 и 16.2 ц/га получена в вариантах с обработкой опытными образцами биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 517 и *B. subtilis* BZR 336g. При этом величина дополнительного урожая от применения препарата Раксил, КС составила 4.7 ц/га (табл. 1).

Заключение. Обработка семян и растений озимой пшеницы новыми биопрепаратами снижает вредоносность фузариоза и обеспечивает получение дополнительного урожая. Проведенные исследования открывают перспективы использования новых агентов биоконтроля возбудителей корневых гнилей фузариозной этиологии озимой пшеницы в сельскохозяйственной практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сираева З.Ю. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней на основе *Bacillus amyloliquefaciens* ВК ПМ В-11008: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2012. – 24 с.
2. Фокин А.В. Биологизация защиты растений – процесс циклический? / А.В. Фокин // Защита и карантин растений. – 2010. №3. - С. 25.
3. Франк Р.И. Биопрепараты в современной земледелии / Р.И. Франк, В.И. Кищенко // Защита и карантин растений. – 2008. №4. - С. 30-32.
4. McSpadden Gardener B.B. Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA / B.B. McSpadden Gardener, D.R. Fravel [http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/biocontrol/html. 10.05.2002].
5. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria / Köhl J., Postma J., Nicot P. [et al.] // Biological control. – 2011. – Vol. 57. – P. 1-12.
6. Иващенко В.Г., Шипилова Н.П., Назаровская Л.А. Фузариоз колоса хлебных злаков. – СПб., 2004. – 164 с.
7. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве – СПб. – 2009. – 378 с.
8. Методические рекомендации по снижению вредоносности фузариоза колоса и зерна озимой пшеницы / В.И. Терехов, В. И. Бессмельцев [и др.] – М. – 1998. – 22 с.
9. Чумаков А. Е. Основные методы фитопатологических исследований – М. – 1979. – 189 с.

УДК 635.92:581.143.6

РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *IRIS* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Ахметова А.Ш., Зарипова А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад-институт Уфимского научного центра
Российской академии наук, г.Уфа, Россия

Одной из задач ботанических садов является сохранение биоразнообразия растений *ex situ*. Многие редкие, исчезающие и эндемичные виды практически не встречаются в естественных местах произрастания из-за усиления антропогенной нагрузки и изменения экологических условий. Представляющие собой ценный генетический ресурс, такие растения сохраняют *ex situ* в ботанических коллекциях закрытого грунта. Это касается не только редких и исчезающих видов, но и интродуцированных ценных и декоративных видов растений. Часто декоративные виды в коллекциях представлены в единичных экземплярах. В связи с этим актуальна разработка различных методов сохранения этих видов. В условиях *ex situ* весьма перспективна работа по использованию метода культуры *in vitro* для получения посадочного материала – растений-регенерантов с целью интродукции. Клональное микроразмножение предоставляет широкие возможности для сохранения и восстановления численности ценных видов растений [1, 2]. К таким растениям можно отнести и некоторые виды рода *Iris* L.

Литературные данные свидетельствуют о возможности получения растений-регенерантов видовых ирисов из различных органов и тканей. Так удалось регенерировать полноценные растения из различных фрагментов цветка [3], из незрелых зародышей [4]. Однако часто при клональном микроразмножении возникает необходимость дифференцированного подхода к размножению отдельных видов растений.

Цель исследования было изучение развития некоторых видов рода *Iris* L. из семян в условиях культуры *in vitro*.

Одним из ключевых моментов размножения *in vitro* является разработка приемов введения растительного материала в стерильную культуру, что предусматривает как выбор экспланта, так и подбор условий стерилизации. При получении асептических линий в качестве исходного материала использовали семена *Iris ensata* Thunb., *Iris pumila* L. и *Iris notha* Vieb., собранные в условиях культуры и полученные по делектусу (Москва, МГУ; 2013). Поверхностную стерилизацию проводили согласно общепринятым методикам с использованием в качестве стерилизующего агента ртутьсодержащее соединение [5, 6, 7].

Для оценки успешности стерилизации посадочного материала использованы следующие показатели: число инфицированных, некротизированных и жизнеспособных эксплантов. Разработанный эффективный прием стерилизации, позволил получить достаточно высокий процент жизнеспособных эксплантов. Результаты опытов показали, что максимального числа жизнеспособных (75 и 89 %), минимального числа инфицированных (9 и 12 %) и некротизированных (2 и 13 %) эксплантов удалось достичь при последовательном выдерживании семян *I. ensata* и

I. pumila в 70 %-ном растворе этанола в течение 1 мин и 0,1 %-ном растворе диацита в течение 10 мин. Семена *I. notha* не взошли (табл. 1).

Таблица 1

Влияние стерилизующих растворов на показатели инфицированности и жизнеспособности семян *I. ensata*, *I. pumila* и *I. notha* в культуре *in vitro*

Стерилизующие растворы		Доля эксплантов, %		
<i>Iris ensata</i>				
концентрация	экспозиция, мин	инфицированных	жизнеспособных	некротизированных
70 % этанол, 0,1 % диацит	1	36,0	31,0	33,0
	8			
70 % этанол, 0,1 % диацит	1	12,0	75,0	13,0
	10			
<i>Iris pumila</i>				
70 % этанол, 0,1 % диацит	1	27,0	63,0	10,0
	8			
70 % этанол, 0,1 % диацит	1	9,0	89,0	2,0
	10			
<i>Iris notha</i>				
70 % этанол, 0,1 % диацит	1	–	–	–
	8			
70 % этанол, 0,1 % диацит	1	–	–	–
	10			

С целью изучения процесса прорастания семян *I. ensata*, *I. pumila* и *I. notha* помещали на безгормональную среду, содержащую минеральные соли по рецептуре MSO и культивировали при 16-часовом фотопериоде, температуре 25±1С°, влажности воздуха не менее 70 %.

Прорастание семян *I. ensata* характеризуется замедленными темпами в начальный период. За первые 10 сут прорастает всего 4 % семян, после чего скорость прорастания увеличивается и почти не снижается на протяжении 15 сут, достигая к этому сроку 80 %. Затем она резко падает, и оставшиеся 11 % семян прорастают в течение 5 сут. Всхожесть семян составила 95 % (рис. 1).

Прорастание семян *I. pumila* отличается от предыдущего типа скачкообразными темпами. За первые 10 сут прорастает 5 % семян, за последующие 5 сут – 17 % (рис. 1). Затем скорость прорастания снижается, и за 5 сут прорастает всего 10 % семян. Далее энергия прорастания резко возрастает, и 5 сут прорастает 46 % семян. До завершения процесса прорастания проходит еще 5 сут (22 % семян). Всхожесть семян равна 89 %.

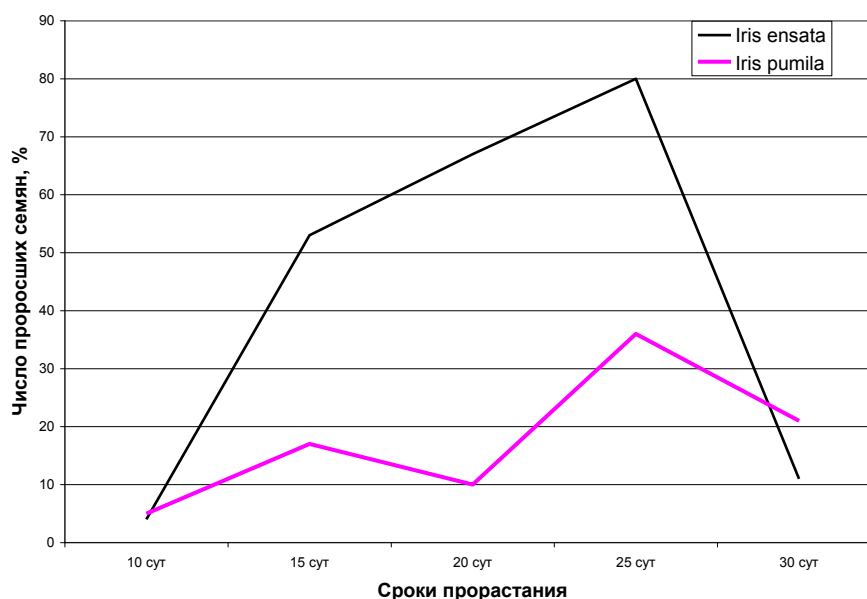


Рис. 1. Прорастание семян *Iris ensata* и *Iris pumila* на безгормональной среде MS

Анализ полученных данных подтверждает, что прорастание семян существенным образом зависит от видовых особенностей.

Проведены исследования по изучению проростков *I. ensata* и *I. pumila*. Для *I. ensata* зафиксировано формирование первого листа в течение 6-14 сут с момента прорастания семян. Для *I. pumila* отмечено формирование первого листа за 8-16 сут. Для формирования побега, имеющего 3-4 развитых листа, растениям *I. ensata* необходимо 25-30 сут, растения *I. pumila* формируют побег в течение 30-40 сут.

Анализ данных, представленных на рисунке 2 свидетельствует о том, что максимальное число листьев *I. ensata* и *I. pumila* формируется на 35-40 сут (рис. 2). Длина наиболее развитого листа *I. ensata* на 40 сут составила 13,8 см, у *I. pumila* – 4,6 см (рис. 3).

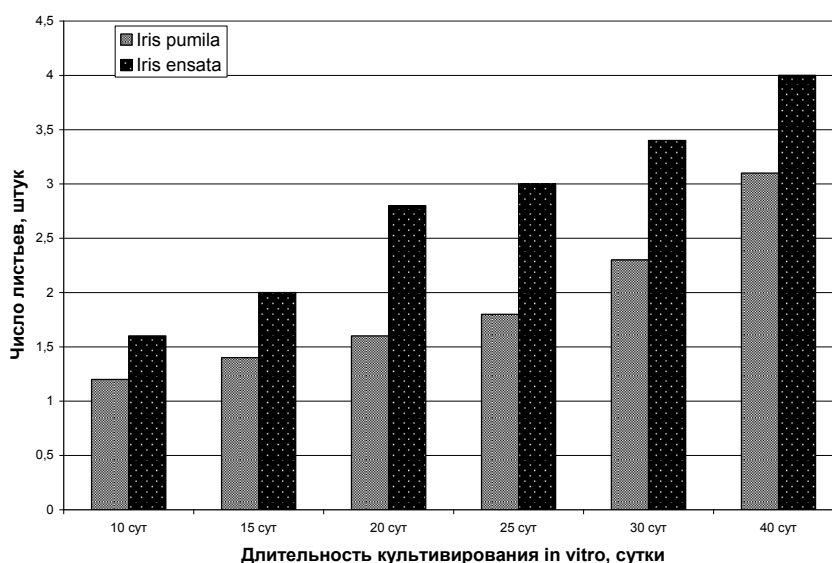


Рис. 2. Изменение числа листьев *Iris ensata* и *Iris pumila* на безгормональной среде MSO

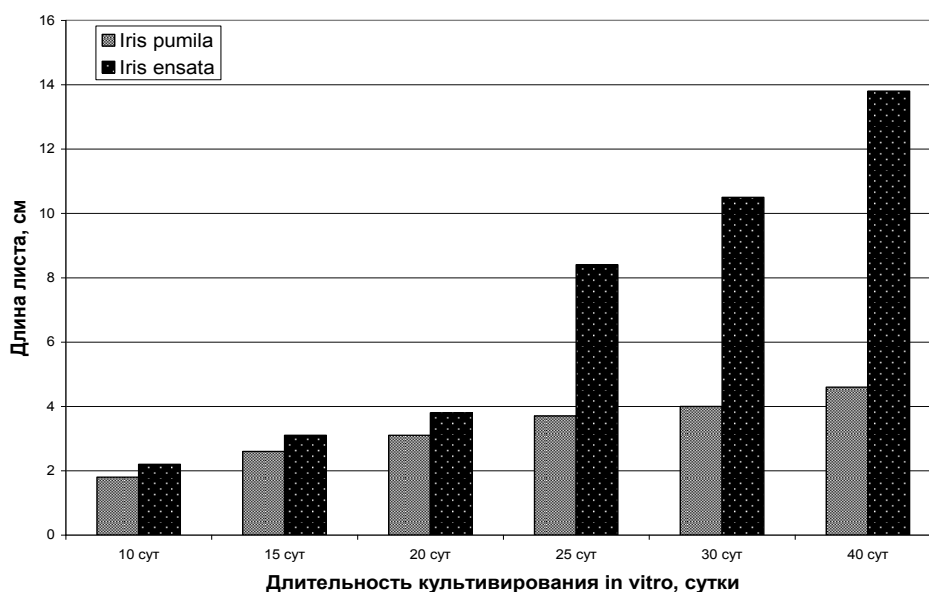


Рис. 3. Изменение длины наиболее развитого листа *Iris ensata* и *Iris pumila* на безгормональной среде MSO

Таким образом, введение в культуру *in vitro* *I. ensata* и *I. pumila* с использованием в качестве эксплантов семян приводит к быстрым положительным результатам. Формирование побега, имеющего 3-4 развитых листа проходит в течение 25-40 суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Л.Н., Горбунов Ю.Н. Сохранение редких и исчезающих растений *ex situ*: достижения и проблемы // Изучение и охрана разнообразия фауны, флоры и основных экосистем Евразии. Материалы Междунар. конф. – М. 2000. – С. 19–23.
2. Коваль С.Ф., Коваль В.С., Тымчук С.М., Богуславский Р.Л. Генетические коллекции: проблемы формирования, сохранения и использования // Цитология и генетика. – 2003. – № 4. – С. 46–53.
3. Тихомирова Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* // Биотехнология и генетика растений. – 2010. – № 13(3). – С. 147–151.
4. Болтенков Е.В. Регенерация растений в каллусной культуре *Iris pseudacorus* (*Iridaceae*) // Раст. ресурсы. – 2011. – № 2. – С. 34–43.
5. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М., 1964. – 272 с.
6. Калинин В. Ф., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
7. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.

УДК 581.1.632.1

ВЛИЯНИЕ РАЗНОГО УРОВНЯ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ В РАСТЕНИЯХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Аюпова Р.Н., Никитина В.С.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Функции вторичных метаболитов высших растений связаны с процессами фотосинтеза, дыхания и устойчивости растений к различным стрессовым воздействиям. Учитывая важную роль в защитных реакциях фенольных соединений, в том числе и флавоноидов при неблагоприятных экологических условиях [1-4], целью нашей работы являлось изучение изменений в накоплении флавоноидов растениями, произрастающими при различной техногенной нагрузке. В качестве объектов исследования были выбраны четыре вида растений – клевер луговой *Trifolium pratense* L., полынь горькая *Artemisia absinthium* L., одуванчик лекарственный *Taraxacum officinale* L., тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium* L., образцы которых были отобраны в фазу конца вегетации на территории трех разных промышленных зон г. Уфы. Контролем служили образцы исследуемых видов растений, произрастающих на удаленном от нефтеперерабатывающих заводов, участке (дер. Щепное Республика Башкортостан), которые были отобраны одновременно с исследуемыми растениями в фазу конца вегетации.

Количественное определение флавоноидов проводили по реакции комплексообразования флавоноидов с хлористым алюминием. Калибровочную кривую строили по рутину. Принятые обозначения, следующие: I – образцы растений, отобранные на территории поселка Новоалександровка; II – образцы растений, отобранные возле очистных сооружений Уфимского НПЗ с северной стороны; III – образцы растений, отобранные возле очистных сооружений Уфимского НПЗ с восточной стороны.

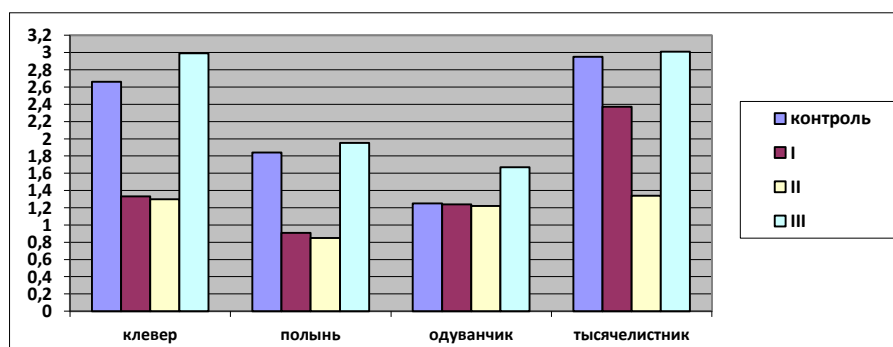


Рис. 1. Содержание флавоноидов в целых растениях: *Trifolium pratense* L., *Artemisia absinthium* L., *Taraxacum officinale* L., *Achillea millefolium* L.

Из полученных данных (рис.1) следует, что уровни накопления флавоноидов у четырех видов исследуемых растений по сравнению с содержанием флавоноидов в контрольных растениях того же вида существенно отличаются. Так в растениях, произрастающих на III участке по сравнению с растениями, отобранными на контрольном участке, для клевера и одуванчика наблюдается максимальное количество флавоноидов.

дов, а для полыни и тысячелистника эти значения близки к уровню содержания флавоноидов в контрольных растениях. Минимальные показатели содержания флавоноидов во всех четырех исследуемых нами видов растений приходятся на растения, произрастающие на II участке. Полученные результаты свидетельствуют о различных условиях произрастания растений, т.е., вероятно, на участке I, участке II, участке III растения испытывают разные техногенные нагрузки. Это обстоятельство сказывается на колебаниях уровней содержания флавоноидов в растениях разных видов. Наблюдаются межвидовые различия в отклике на техногенные нагрузки. Изменчивость содержания флавоноидов в клевере варьирует в пределах (49÷112%_{отн}), полыни – (46÷106%_{отн}), одуванчике – (98÷134%_{отн}), тысячелистнике – (45÷102%_{отн}), из чего следует, что одуванчик более других исследуемых растений был подвержен влиянию техногенной нагрузки.

Кроме определения содержания флавоноидов, нами определялся фракционный состав фенольных соединений в растениях, произрастающих на разных территориальных участках. Из образцов полыни горькой, произрастающей на контрольном в данной работе участке и образцах этого растения, произрастающего на участке III, проведено экстракционное фракционирование фенольных соединений по известной методике [5]. Извлечение фенольных соединений проводили последовательным экстрагированием воздушно - сухого растительного материала растворителями возрастающей полярности. Петролевым эфиром удаляли основную массу хлорофилла и терпеноидных соединений, не затрагивая фенольных соединений. Затем последовательно извлекали эфирную, этилацетатную и спиртовую фракцию фенольных соединений. Полученные результаты представлены на рис. 2.

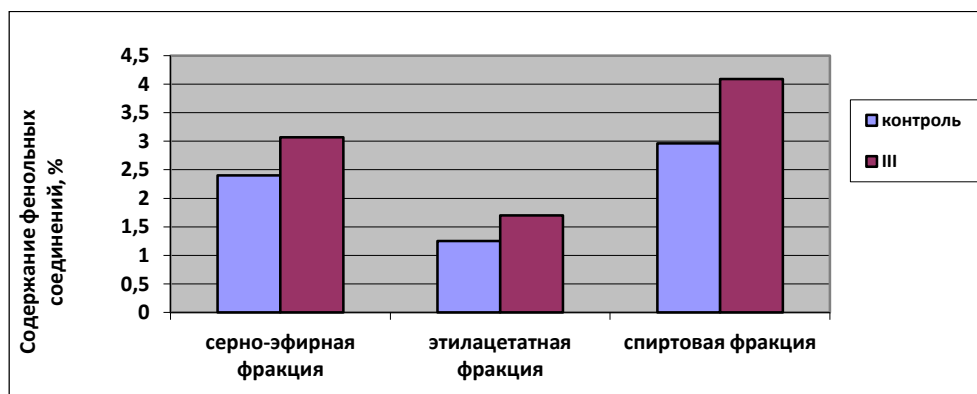


Рис. 2. Содержание фенольных соединений разных фракций в надземной части полыни горькой, произрастающей на контрольном и III-ем участках.

Полученные результаты показали более высокий уровень накопления фенольных соединений в этилацетатном и спиртовом экстрактах у растений, произрастающих на III участке по сравнению с их содержанием в экстрактах из растений, произрастающих на контрольном участке. Данные результаты свидетельствуют о различной степени технозагрязненности площадей, на которых произрастали растения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Медведев С.С. Физиология растений. Изд. С.-Петербургского университета. 2004. 335 с.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука. 1992. 382 с.

3. Никитина В.С., Абдуллин М.И. Растительные фенольные соединения – индикаторы промышленного загрязнения среды // Материалы VII междунар. симп. по фенольным соединениям. М., 2009. С. 188-189.
4. Кусакина М.Г., Еремченко О.З., Четина О.А. Влияние разного уровня техногенного засоления на некоторые показатели обмена веществ растений // Вестник Пермского университета, 2011, вып.1.
5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 185-197.

УДК 664.8.014/.019

ФЛАВОНОИДЫ ВИНОГРАДА КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Батькова И.А., Макарова Н.В.

ФГБОУ ВПО Самарский государственный технический университет, г. Самара, Россия

Виноград - одна из самых древних земледельческих культур. Растение представляет собой древесную лиану из семейства виноградовых. Виноград культурный преимущественно выращивают в умеренной и субтропической зонах. Однако в наше время многие культурные сорта винограда прочно обосновались в средней полосе России и в том числе в Самарской области [1].

Виноград - это отличное общеукрепляющее и тонизирующее средство. В плодах винограда содержатся сахар, клетчатка, органические кислоты, аскорбиновая кислота, витамин В, пектиновые вещества, микроэлементы, ферменты. Установлено, что виноград оказывает стимулирующее действие на костный мозг. Это способствует улучшению функций кроветворных органов. Виноград - хороший источник калия [2].

Виноград и виноградный сок рекомендуются при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся пониженной секрецией желудочного сока. Виноград очень полезен при острых воспалительных процессах дыхательных путей, при бронхиальной астме и плеврите. Виноградные ягоды или сок - это эффективное средство лечения многих заболеваний сердечно-сосудистой системы [3]. Виноградные косточки обладают мощным антиоксидантным действием, способствуют очищению и оздоровлению организма, обновлению клеток и омоложению кожи. Спиртовой экстракт косточек винограда снижает содержание холестерина, регулирует кровяное давление, защищает и восстанавливает сосуды, благотворно действует на сон, укрепляет иммунитет. Масло из виноградных косточек богато витаминами Е, А, В, С и РР, микроэлементами и уникальным составом жирных кислот. Оно благотворно действует на иммунную систему, укрепляет и делает эластичными стенки кровеносных сосудов, способствует снижению уровня холестерина, положительно воздействует на почки, предотвращает появление онкологических болезней

Ценность винограда в том, что он содержит флавоноиды, фенольные соединения желтого, красного, оранжевого цветов. Флавоноиды не синтезируются организмом че-

ловека и попадают с пищей. В настоящее время исследования показывают, что флавоноиды играют жизненно важную роль в организме человека. Они могут изменять активность ферментов, вырабатываемых организмом для обмена веществ [4].

Целью наших исследований было изучение флавоноидов шести сортов винограда: четырех выращенных в Самарской области: Мерло, Альфа, Левокумский, Регент, одного сорта в Молдавии: Изабелла, одного сорта в Узбекистане: Киш-Миш.

Содержание флавоноидов определяется нитратоалюминиевым колориметрическим методом, при котором нитрат алюминия взаимодействует с кето-группой флавоноидов, образуя стабильный кислотный комплекс, показывающий устойчивую спектрально-поглощательную способность при 415 нм [5].

Результаты исследования флавоноидов в мякоти, кожице и косточках винограда

Сорта винограда	Общее содержание флавоноидов, мг катехина/ 100 г сырья
Мерло	
Мякоть	104
Кожица	172
Косточки	521
Регент	
Мякоть	48
Кожица	464
Косточки	637
Левокумский	
Мякоть	19
Кожица	256
Косточки	1206
Изабелла Самара	
Мякоть	9
Кожица	115
Косточки	876
Изабелла Молдавия	
Мякоть	12
Кожица	163
Косточки	1638
Киш-Миш	
Мякоть	19
Кожица	154

Из таблицы можно сделать вывод, что наибольшее количество флавоноидов содержится в косточках винограда. Косточка содержит свободные радикалы, которые защищают наш организм от сердечно - сосудистых заболеваний (укрепляются стенки сосудов). Также косточки винограда широко применяются в косметологии.

Таким образом, виноградные косточки оказывают на наш организм только положительное влияние, а виноград, в свою очередь, играет ключевую роль в предотвращении бесчисленных нарушений здоровья и может быть использован в качестве домашнего средства от многих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глущенко В.Т., Березовский Ю.С. Виноград. – М.: АСТ, 2008. 108 с.
2. Надежда Стогова. Виноград против ста болезней. – СПб.: Питер, 2006. 96 с.
3. Дудкин М.С., Щелкунов Л.Ф. Проблема комплексного использования винограда и пути ее решения // Хранение и переработка сельхозсырья. 2000. №1. 56-59 с.
4. Чуб В. Для чего нужны антоцианы // Цветоводство. — 2008. — № 6. — С. 22—25.
5. Mojca Skerget, Petra Kotnik, Majda Hadolin, Andreja Rizner Hras, Marjana Simonc, Zeljko Knez. // Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities.// Food Chemistry. 2005. Vol. 89. N 1. P. 191-198.

УДК 664.8.014/.019

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ КОСТОЧЕК ВИНОГРАДА
С АНТИОКСИДАНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ: ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ**

Батькова И.А., Макарова Н.В.

ФГБОУ ВПО Самарский государственный технический университет, г. Самара, Россия

Виноградные косточки составляют наибольший объем от отходов производства вина. Чаще всего они либо поступают на корм скоту, либо вообще выбрасываются. Однако за последние двадцать лет активизировались исследования по использованию экстрактов косточек винограда в качестве ингибиторов липидного окисления.

Окисление липидов является одним из основных процессов, ограничивающих сроки хранения многих пищевых продуктов. Липиды присутствуют почти во всех видах сырья, чаще всего в виде триглицеридов, накапливающихся в жировых клетках животных и растений, и фосфолипидов, которые входят в состав биологических мембран. При производстве разнообразных пищевых продуктов жиры могут добавляться в качестве рецептурных ингредиентов. Жиры являются основным компонентом многих пищевых продуктов, в том числе майонеза, маргарина и различных масел для жарки. Эти жиры почти полностью состоят из триглицеридов, и именно эти компоненты становятся основными потенциальными источниками возникновения «окислительных» посторонних привкусов. Причиной окислительной порчи могут быть и фосфолипиды, присутствующие во всех биологических мембранах животных и растительных тканей [1].

Кроме антиоксидантных свойств, косточки винограда обладают антипролиферативными [2] и антибактериальными [3] свойствами. Экстракция растительного материала является сложным процессом, который зависит от целого ряда факторов. Среди которых одно из важнейших мест занимает природа растворителя для экстракции [4, 5, 6].

Целью данной работы является определение оптимального растворителя для получения экстрактов из косточек винограда с максимальным содержанием фенолов, флавоноидов, танинов и антиоксидантной активностью.

Объектами исследования являются высушенные при температуре 50 °С косточки винограда сортосмеси: Левокумский, Мерло, Регент, полученные после отжима виноградного сула.

В качестве растворителя использовались наиболее безопасные и экологически безвредные: вода, этиловый спирт, смесь воды и этилового спирта в разных соотношениях. Для исследований использовались следующие методы анализа: измерение общего содержания фенольных веществ, общего содержания флавоноидов, общего содержания танинов общего содержания антоцианов, измерение уровня улавливания свободных радикалов DPPH (2,2'-дифенил-1 пикрилгидразила), способности улавливать радикалы ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоная кислота)), общей антиоксидантной силы по методу FRAP (ferric reducing antioxidant power с реагентом 2,4,6-трипиридил-*s*-триазином), антиоксидантной активности на модели с линолевой кислотой.

Результаты определения химического состава и антиоксидантной активности экстрактов виноградных косточек, представлены в таблице 1, 2.

Таблица 1

Результаты определения антиоксидантной активности экстрактов
 виноградных косточек

Показатели Растворители	E _{c50} , мг/мл	ABTS μмоль тролокса/ г сырья	FRAP значе- ние, ммоль Fe ²⁺ / 1 кг сы- рья	Антиоксидантная актив- ность в системе линолие- вая кислота, % ингибиро- вания окисления линолие- вой кислоты
100% H ₂ O	6,9	3,8	28,08	Не обнаружено
30% C ₂ H ₅ OH	1,6	6,46	35,90	Не обнаружено
50% C ₂ H ₅ OH		8,93	35,60	Не обнаружено
70% C ₂ H ₅ OH	0,4	10,16	33,80	Не обнаружено
100% C ₂ H ₅ OH	0,4	26,3	31,59	19,8%

Исходя из результатов таблицы 1, можно сказать, что по способности улавливать свободные радикалы DPPH, а также радикалы ABTS наиболее лучшим растворителем для получения экстракта из косточек винограда является 100% C₂H₅OH.

По уровню показателей FRAP для получения экстракта из виноградных косточек могут подойти все растворители за исключением 100% H₂O.

Таблица 2

Результаты определения химического состава экстрактов виноградных косточек

Показатели Растворители	Общее содержание фенолов, мг галловой кисло- ты/ 100 г сырья	Общее содержание флавоноидов, мг катехина/ 100 г сырья	Общее содержа- ние танинов, мг катехина/ 100 г сырья
100% H ₂ O	787,2	348	14,80
30% C ₂ H ₅ OH	1253	1308	36,72
50% C ₂ H ₅ OH	1166	1480	72,8
70% C ₂ H ₅ OH	1214	1712	52,1
100% C ₂ H ₅ OH	1334	2778	87,36

Из таблицы 2 видно, что наиболее оптимальным растворителем для получения экстрактов из косточек винограда является 100% C₂H₅OH, так как, данный растворитель обеспечивает наибольшее число фенольных веществ.

По содержанию флавоноидов, танинов наиболее оптимальным растворителем для косточек является 100% C₂H₅OH.

Исходя из полученных результатов для получения экстрактов из косточек винограда с наивысшей антиоксидантной силой и максимальным содержанием фенолов, флавоноидов, танинов лучше всего подходит в качестве растворителя 100% C₂H₅OH. Таким образом, данный растворитель может являться наиболее подходящим для получения экстрактов из отходов виноделия – виноградных косточек с наивысшей антиоксидантной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стеле Р. Срок годности пищевых продуктов: Расчет и испытание. – Спб.: Профессия, 2008. 480 с.
2. Lutterodt H., Slavin M., When M., Turner E. Fatty acid composition oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. // Food Chem. 2011. Vol. 128. N 2. P. 391-399.
3. Baydar N.G., Sagdic O., Ozkan G., Cetin S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. // Int. J. Food Sci. and Technol. 2006. Vol. 41. N 7. P. 799-804.
4. ju Zhi Y., Howard Luke R. Subcritical water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. // J. Food Sci. 2005. Vol. 70. N 4. P. 270-276.
5. Garcia-Marino M., Rivas-Gonzalo Julian C., Ibanez E., Garcia-Moreno C. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by products using subcritical water extraction. // Anal. chim. acta. 2005. Vol. 563. N 1-2. P. 44-50.
6. Floris T., Filippino G., Scrugli S., Pinna M. B., Argiolas A., Murru M., Reverchon E. Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process. // J. Supercrit. Fluids. 2010. Vol. 54. N 2. P. 165-170.

УДК 664.8.014/.019

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ СУШКИ НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ВИНОГРАДНЫХ ВЫЖИМОК

Батькова И.А., Макарова Н.В.

ФГБОУ ВПО Самарский государственный технический университет, г. Самара, Россия

Виноград известен людям с наидревнейших времён. Он является широко используемой культурой именно благодаря своему уникальному химическому составу. В его ягодах содержатся сахара (главным образом глюкоза и фруктоза), ферменты, вита-

мины, микроэлементы, органические кислоты, азотистые, фенольные и другие весьма важные для здоровья человека вещества [1].

В ряду культурных растений виноград выделяется многообразием ценных свойств. Это - питательный, диетический и лечебный продукт. Один килограмм свежих ягод винограда обеспечивает около 30% калорий дневного рациона человека. В его ягодах содержится 14-30% сахаров (в основном глюкозы и фруктозы), значительное количество органических кислот (винной, яблочной, лимонной и др.), повышающих аппетит и процессы пищеварения, а также предупреждающих образование камней в почках. Виноград и виноградный сок используются как лечебные средства при кормлении отстающих в развитии детей, для оздоровления больных сердечными и желудочно-кишечными заболеваниями, полиартритами, после перенесенных операций. В мускатных сортах содержатся антибиотические ароматические соединения. Пектиновые вещества, содержащиеся в кожице темноокрашенных ягод, связывают в нерастворимые соли радиоактивные металлы и таким образом выводят их из организма. [2].

Основным и очень популярным продуктом, получаемым из винограда, является виноградное вино. Однако, при его производстве образуется очень большое количество отходов - виноградных выжимок и косточек. А ведь именно эти продукты могут стать исходным сырьем для производства полуфабрикатов, содержащих повышенное количество биологически активных соединений [3-5].

Одно из важнейших свойств фенольных компонентов виноградных выжимок - способность выступать в качестве антиоксидантов, то есть тормозить процессы окисления липидов в жиросодержащих системах [6]. Основное количество выжимок образуется в период сбора винограда и переработки на вино. Такое количество быстропортящихся отходов нельзя сохранить без дополнительной обработки. Сушка является одним из способов хранения скоропортящихся продуктов. Также сушка предлагается и в качестве метода консервирования виноградных выжимок [7]. Однако, целенаправленные исследования по влиянию параметров сушки на химический состав и антиоксидантную активность виноградных выжимок не проводились.

Целью наших исследований является оценка влияния трех температур сушки 50-52°C, 100-102°C, 130-132°C при конвективной сушке на изменение химического состава (общего содержания фенолов, флавоноидов, антоцианов, антиоксидантной активности (способности улавливать свободные радикалы 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила, DPPH), восстанавливающей силы по методу FRAP, способности ингибировать окисление на модели с линолевой кислотой) виноградных выжимок и косточек.

Объектами исследования являются выжимки сортосмеси винограда сортов Мерло, Левокумский и Регент урожая 2012 года, собранных на территории Самарской области.

Целью наших исследований является: измерение общего содержания фенольных веществ с помощью реактива Folin-Ciocalteu, общего содержания флавоноидов, общего содержания антоцианов, измерение уровня улавливания свободных радикалов DPPH, общей антиоксидантной силы по методу FRAP (ferric reducing antioxidant power с реагентом 2,4,6-трипиридил-*s*-триазином), антиоксидантной активности на модели с линолевой кислотой [8-12].

Результаты определения химического состава и антиоксидантной активности представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты исследования химического состава виноградных выжимок высушенных при разных температурных режимах

Показатели	Общее содержание фенолов, мг галловой кислоты/ 100 г сырья	Общее содержание флавоноидов, мг катехина/ 100 г сырья	Общее содержание антоцианов, мг цианидин-3-гликозида/100 г сырья	E _{c50} , мг/мл	FRAP-значение, ммоль Fe ²⁺ / 1 кг сырья	Антиоксидантная активность в системе линолевая кислота, % ингибирования окисления линолевой кислоты
50-52°C	1166	1280	964,4	3,2	37,26	20,9
100-102°C	1143	798	97,5	2,7	37,8	8,5
130-132°C	1128	792	257,8	3,9	34,2	Не обнаружена

Исходя из таблицы можно сделать вывод, что наибольшее число флавоноидов и фенолов сохраняются при низких температурах сушки, а с повышением температуры наступает деструкция почти всех веществ, отвечающих за антиоксидантную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кишковский З.Н., Скурихин И.М. Химия вина. – М.: Агропромиздат. 1988. 256 с.
2. Докучаева Е.С., Комарова Е.С., Пилипенко Н.Н. Сорта винограда. – Киев: Урожай. 1986. 272 с.
3. Тагирова П.Р., Касьянов Д.Г. Переработка виноградных выжимок и виноградных семян с использованием жидкого диоксида углерода. // Изв. вузов. Пищ. технол. – 2010. №2-3. С. 60-62.
4. Кондратьев Д.В., Щеглов Н.Г. Оптимизация процессов извлечения биологически активных веществ из виноградных выжимок. // Изв. вузов. Пищ. технол. – 2008. №1. С. 45-46.
5. Гиашвили М.Д., Танащук Т.Н. Перспективы использования виноградной выжимки как источника биологически активных добавок. // Виноделие и виноградарство. – 2005. №6. С. 37-38.
6. Özvural E.B., Vural H. Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. // Meat Sci. 2011. Vol. 88. N 1. P. 179-183.
7. Khanal Ramesh C., Howard Luke R., Prior Ronald L. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. // Food Res. Int. 2010. Vol. 43. N 5. P. 1464-1469.
8. Ramila Guendez, Stamatina Kallithraka, Dimitris P. Makris, Panagiotis Kefalas. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis uinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. // Food Chemistry. 2005. Vol. 89. N 1. P. 1-9.
9. Mojca Skerget, Petra Kotnik, Majda Hadolin, Andreja Rizner Hras, Marjana Simonic, Zeljko Knez. // Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry. 2005. Vol. 89. N 1. P. 191-198.

10. Maria S.M. Rufino, Fabiano A.N. Fernandes, Ricardo E. Alves, Edy S.de Brito. Free radical-scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits. // Food Chemistry. 2009. Vol. 114. N 4. P. 693-695.
11. Jessica Nilsson, Rolf Stegmark, Bgorn Akesson. // Total antioxidant capacity in different pea (*Pisum sativum*) varieties after blanching and freezing. Food Chemistry. 2004. Vol. 86. N 3. P. 501-507.
12. Mohammadzadeh S., Sharriatpanahi M., Hamed M., Amanzadeh Y., Sadat Ebrahimi S. E., Ostad S. N. Antioxidant power of Iranian propolis extract. - Food Chemistry. – 2007. - Vol. 103. - № 3. – P. 729-733.

УДК 571.27

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕТИЛЖАСМОНАТА НА АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА В ЛИСТЯХ КАРТОФЕЛЯ

Валиахметова К.И, Марданшин И.С, Цветков В.О., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет, г.Уфа, Россия

Применение химических средств защиты сельскохозяйственных культур от патогенов и фитофагов сопровождается появлением устойчивых к химическим препаратам популяций организмов, усилением загрязнения окружающей среды и продукции сельского хозяйства ксенобиотиками различного происхождения. Кроме того использование пестицидов нарушает биоценотические связи в агроэкосистемах, способствует неизбирательному уничтожению консументов второго порядка – естественных врагов фитофагов.

Поэтому актуальной задачей остается поиск альтернативных путей защиты растений, основанных на природных механизмах устойчивости и биорегуляции.

Использование новых устойчивых сортов растений является одним из основных факторов направляющим микроэволюционные процессы адаптации фитофагов в агроэкосистемах. Показано, что именно применение устойчивых форм растений с преобладанием механизмов ингибиторного барьера, неизбирательно воздействуя на фитофага, способствует сохранению замедленных приспособительных реакций консументов. Ингибиторы пищеварительных ферментов из тканей растений вызывают раннее чувство насыщения, снижают усвояемость пищевых субстратов, энергетическую ценность и уровень обмена веществ, активизирующиеся при этом компенсаторные механизмы с изменением спектра и активности ферментов недостаточны, что в конечном счете приводит к замедлению скорости развития, уменьшению массы тела, плодовитости, высокой смертности вредителей [1,7, 11].

Как правило, эффективный защитный ответ на повреждения фитофагами способны оказывать ингибиторы трипсина-, химотрипсина- и эластазоподобных протеаз насекомых, исследованию которых посвящено большое число работ [1,2,3,6].

Одним из экологически безопасных подходов для активации и интенсификации защитного потенциала растений является использование физиологически активных веществ и их синтетических аналогов.

Жасмоновая кислота (ЖК) и ее метиловый эфир (МЖ), сочетая в себе функции сигнального интермедиата и фитогормона, являются регуляторами роста и развития растений, участвуют в реализации механизмов индуцированной системной устойчивости в ответ на атаку некротрофами и фитофагами. ЖК тормозит рост корней, удлинение стебля, стимулирует образование пыльцы и растрескивание пыльников, тормозит образование каллуса, ускоряет старение и опадение листьев, снижает уровень хлорофилла, способствует закрытию устьиц, стимулирует образование клубней и луковиц, влияет на некоторые реакции фотосинтеза. Жасмонаты влияют на экспрессию генов, усиливая их транскрипцию, изменяя стабильность транскриптов, их трансляцию и посттрансляционную модификацию белков. Как вторичные посредники синтезируемые в растениях в ответ на атаку патогенов, эти гормоны приводят в движение всю программу экспрессии генов защиты, включающую на начальных этапах синтез защитных белков растений, а на последнем этапе – общее подавление синтеза белка. Жасмонат и его производные осуществляют регуляцию синтеза вторичных метаболитов и защитных белков: индуцируют синтез алкалоидов, терпеноидов, глюкозинолатов, фенолов, глюкозинолатов, фитоалексинов, осмотина, пролинбогатых белков, экстензинов, бетаина, системаина, тионинов, ингибиторов протеиназ, рибосом-инактивирующих белков, ферментов метаболизма фенилпропаноидов и некоторых других белков, кроме того, может взаимодействовать с гормонами (АБК, этиленом, ИУК), показана способность жасмонатов увеличивать активность НАДФН-оксидазы, а также многих антиоксидантных ферментов. Показано положительное влияние жасмонатов на тепло- и солеустойчивость, а также к загрязнению тяжелыми металлами [4, 5, 8].

Обработка метилжасмонатом вызывает у растений физиологические эффекты, характерные для самой жасмоновой кислоты, в том числе инициацию синтеза стрессовых белков.

Перспективность использования препаратов метилжасмоната хорошо показана на примерах с фитопатогенами [9,10]. Однако аналогичные исследования по фитофагам пока еще малочисленны.

Целью нашей работы было определение влияния экзогенной обработки метилжасмонатом интактных растений картофеля на активность ингибиторов трипсина.

В работе были использованы листья картофеля сорта Удача, предоставленные Лабораторией селекции и семеноводства картофеля Башкирского НИИСХ РАСХН.

Определение активности ингибиторов трипсина проводили в листьях картофеля обработанного метилжасмонатом (МЖ) и с нанесенной кладкой яиц колорадского жука, в качестве элиситоров, через 6, 12, 24, 48 часов после обработки. В качестве контроля использовали листья интактных картофеля отобранные с такой же периодизацией. Экстракцию проводили холодным 0,05 М Трис-НСl буфером рН 8,2 в течение 40 мин при 4°C, в соотношении 1:50. Полученный экстракт центрифугировали (Eppendorf Centrifuge 5417R) 10 мин 10 000 об/мин. Супернатант разбавлялся в 5 раз и использовался для определения активности. Активность ингибиторов оценивали по степени подавления ферментативной активности трипсина, в качестве хромогенного субстрата использовался БАПНА. Для определения активности связанных ингибиторов экстракты прогревали при температуре 80°C в течение 8 минут и измеряли ингибирующую активность.

Определение проводили в пятикратной биологической повторности.

Таблица 1.

Активность ингибиторов трипсина в листьях картофеля, обработанных МЖ
 или пораженных колорадским жуком

Время после обработки, ч.	Обработка	Активность ингибиторов в мИЕ/мл экстракта	Активность ингибиторов после прогревания в мИЕ/мл экстракта
6	контроль	3,93±0,41	4,96±0,44
	метилжасмонат	4,93±0,44	4,39±0,4
	кладка яиц	5,18±0,25	5,26±0,5
12	контроль	5,16±0,42	4,36±0,61
	метилжасмонат	5,26±0,38	4,77±0,29
	кладка яиц	4,4±0,41	3,98±0,34
24	контроль	4,31±0,24	5,07±0,51
	метилжасмонат	4,51±0,43	4,13±0,62
	кладка яиц	4,37±0,42	5,22±0,7
48	контроль	5,63±0,4	5,33±0,41
	метилжасмонат	5,83±0,27	6,24±0,38
	кладка яиц	4,02±0,43	4,97±0,38

Как видно из таблицы 1, обработка растений картофеля МЖ и поражение колорадским жуком (откладка яиц насекомых) изменяет уровень активности ингибиторов протеиназ. Так, через 6 часов после обработки отмечается повышение активности ингибиторов трипсина из листьев картофеля и при обработке метилжасмонатом и при наличии кладки яиц насекомого, на 25% и 31% соответственно по сравнению с контролем. По истечении 12 часов ингибиторная активность снижалась у обработанных метилжасмонатом растений на ≈15 %. Через 48 часов активность ингибиторов трипсина снижается у растений, с нанесенной кладкой яиц на ≈15%. Как видно, наибольшее увеличение ингибиторной активности при воздействии экзогенного метилжасмоната наблюдается через 6 часов после обработки. Кладка яиц колорадского жука вызывала сначала повышение, а потом снижение активности ингибиторов трипсина по сравнению с контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валуева Т.А., Мосолов В.В. Роль ингибиторов протеаз в защите растений // Успехи биологической химии. – 2002. - Т. 42. – С.193-216.
2. Валуева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. Роль ингибиторов протеиназ в защите картофеля // Биоорганическая химия. – 2003. – т.29. - №5. – с 499-504.
3. Ибрагимов Р.И., Яруллина Л.Г., Ахметов Р.Р. Активность свободных и связанных ингибиторов протеиназ в проростках пшеницы при поражении корневой гнилью // Сельскохозяйственная биология. – 2000. - №3. – 89-92.
4. Капустин М.А., Гавриленко Н.В., Лапковская Е.М., Юрин В.М., Пашковский Ф.С., Лахвич Ф.А. Влияние обработки семян тритикале сорта «Микола» синтетическими простогландами на биохимические процессы в проростках// Труды БГУ. – 2011. – Т.6. – ч.1. – С. 231-244.
5. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Жасмоновая кислота у растений: синтез, сигналинг и физиологические эффекты при стрессах // Вестник харковского национального аграрного университета. – 2010. – вып. 1 (19). – С. 21-33.

6. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Панина Я.С., Чаленко Г.И. Действие иммуномодуляторов на устойчивость и восприимчивость картофеля к *Phytophthora infestans* // Физиология растений. – 2006. – Т.53. - №4. – С. 546-553.
7. Павлюшин В.А., вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Фасулати С.Р., Нефедова Л.И. Индуцированный иммунитет сельскохозяйственных растений и трансгенные сорта в решении проблем оптимизации функционирования агроэкосистем // Агро XXI. – 2008. - № 1-3. – С.9-14.
8. Петрова М.О., Черменская Т.Д. Влияние метилжасмоната на развитие оранжерейной белокрылки в закрытом грунте // Вестник защиты растений. – 2013. – Т. 3. – С. 71-75.
9. Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойкости растений. - СПб, 2002. – 328 с.
10. Тютюрев С.Л. Физиолого-биохимические основы управления стрессоустойчивостью растений в адаптивном растениеводстве // Вестник защиты растений. – 2000. – Т.1. – С. 21-24
11. Щербаков В.Г., Москвич И.А. Влияние протеиназ и их ингибиторов на пищевую ценность белков // Известия вузов. Пищевая технология. – 2006.- 34. – С. 35-36.

УДК 571.27

РОЛЬ ЭНДОФИТНОЙ БАКТЕРИИ *BACILLUS SUBTILIS* 26Д И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ PR-БЕЛКОВ В ИНФИЦИРОВАННЫХ *SEPTORIA NODORUM* BERK. РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ

Веселова С.В., Бурханова Г. Ф., Нужная Т. В., Максимов И. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г.Уфа, Россия

Изучено влияние последовательной обработки жасмоновой кислотой и эндофитной бактерией *Bacillus subtilis* 26Д на транскрипционную активность генов PR-белков в листьях растений пшеницы инфицированных гембиотрофным грибом *Septoria nodorum* Berk. Повышение устойчивости растений пшеницы к септориозу под влиянием *Bacillus subtilis* 26Д и ЖК сопровождалось накоплением транскриптов генов PR-2, PR-3, PR-9, а интерференция защитного ответа растений пшеницы к возбудителю септориоза под влиянием совместной обработки *B. subtilis* 26Д и ЖК зависела от подбора концентрации этой сигнальной молекулы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *Septoria nodorum* Berk., жасмоновая кислота, *Bacillus subtilis*, PR-белки.

Введение

Применение стимулирующих рост растений микроорганизмов (СРРМ) в качестве экологически безопасных биопрепаратов представляется привлекательным, так как в дополнение к их ростстимулирующей активности, эти микроорганизмы способны, активизируя различные стороны метаболизма, обеспечивать высокий иммунный статус растений и повышать их неспецифическую устойчивость к широкому спектру

патогенов, т.е. запускать так называемую системную индуцированную устойчивость (СИУ) [1, 2, 3].

Формирование СИУ предполагает индукцию экспрессии ряда генов защитных PR-белков (pathogenesis related-proteins) [2, 4], принимающих участие в предотвращении развития и распространения патогена. К их числу относятся протеазы, хитиназы, глюканазы, пероксидазы, антимикробные вещества, тионины, дефенсины и др. [5]. Есть мнение, что обработка СРРМ подготавливает растения к атаке патогенов и создает условия для более быстрой и сильной активации защитных механизмов [6]. Так ризосферная бактерия *Pseudomonas putida* LSW17S способствовала более раннему и сильному накоплению транскриптов генов *PR-1*, *PR-2*, *PR-5* и *PR-12* в растениях арабидопсиса, инокулированных патогенной бактерией *P. siringae* DC3000 [7]. Однако до сих пор нет точного объяснения механизма запуска СРР микроорганизмами защитной системы растений-хозяев.

Экспрессия генов PR-белков в растениях, индуцируется различными патогенами и находится под контролем гормонов, ответственных за развитие защитных реакций – салициловой кислоты (СК), жасмоновой кислоты (ЖК) и этилена [4]. СИУ опосредованная СРР микроорганизмами развивается в основном по ЖК/этиленовому пути [7]. ЖК участвует в активации транскрипции генов ферментов фенольного метаболизма, ряда пероксидаз, ингибиторов протеиназ и др. [8]. Однако информация о роли ЖК в этих процессах не полна и противоречива, особенно по однодольным растениям.

В нашей работе было изучено влияние последовательной обработки ЖК и эндофитной бактерией *Bacillus subtilis* (штамм 26Д) на активность транскрипции генов PR-белков, кодирующих β -1.3-глюканазу (*PR-2*), хитиназу (*PR-3*) и анионную пероксидазу (*PR-9*).

Материалы и методы

Объектом исследований служили 10-суточные проростки мягкой яровой пшеницы, восприимчивого к *S. nodorum*, сорта Жница, выращенные в лабораторных условиях на водной культуре (16-часовой световой день, 10 клюкс при 20/24°C ночь/день). Перед посадкой семена замачивали на 2 часа в растворах ЖК разных концентраций (10^{-7} М и 10^{-12} М), контроль замачивали в воде. За 3 дня до инфицирования половину всех растений опрыскивали суспензией спор эндофитного штамма бактерии *Bacillus subtilis* 26Д в концентрации 10^8 кл/мл, другую половину обрабатывали дистиллированной водой. Срезанные первые листья проростков всех вариантов обработок помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). Через 24 ч листья инфицировали суспензией пикноспор агрессивного штамма гриба *S. nodorum* (10^5 спор/мл) из коллекции лаборатории.

Выделение общей РНК проводили с использованием тризола (TRI Reagent), согласно протоколу фирмы-поставщика ("Sigma-Aldrich", США), из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте через 24 и 72 ч после инокуляции. Для получения кДНК на основе мРНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы согласно протоколу фирмы-поставщика («Синтол», Россия). Полимеразно-цепную реакцию (ОТ-ПЦР) проводили в 20 мкл общего объема смеси с реактивами ("Sileks", Россия) в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-Терцик ("ДНК-Технология", Россия) с использованием соответствующих праймеров к генам анионной пероксидазы [9], *PR-2* и *PR-3* белков [10]. В качестве положительного контроля использовали реакцию амплификации конститутивно экспрессирующегося гена, кодирующего белок подобный ингибитору РНКазы-L пшеницы (RNase

L inhibitor-like protein) *RLI(a)* [11]. Данные активности транскрипции изученных генов нормализованы против активности транскрипции гена *RLI(a)* и представлены в % от контроля. Площадь зоны поражения измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html). Все опыты проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторностях. При обработке результатов использовали компьютерные программы Statistica 6.0 (“StatSoft”, Россия). В табл. и на рисунке приведены средние значения биологических повторов и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

В данной работе был проведен анализ развития болезни, который показал, что, в инфицированных растениях, обработанных ЖК (10^{-7} М) или *B. subtilis* 26Д наблюдалось многократное торможение развития болезни по сравнению с необработанными растениями, что предполагает их иммунизирующий эффект (табл. 1). Однако, совместное применение ЖК (10^{-7} М) и бактерии приводило к снижению защитного эффекта и более сильному развитию инфекции (табл.1). Можно предположить, что при совместном применении ЖК и *B. subtilis* 26Д на отрезках листьев пшеницы происходит интерференция индивидуально запускаемых ими сигнальных путей, формирующих устойчивость к патогену, подобно тому, как это показано при совместном использовании СК и ЖК на растениях пшеницы [12].

Таблица 1.

Влияние жасмоновой кислоты и *B. subtilis* 26Д на развитие септориоза в листьях растений пшеницы через 7 сут после инфицирования.

Варианты	Площадь поражения, мм ²
Контроль	42.1±3.1
<i>B. subtilis</i> 26Д	12.0±0.6
ЖК 10^{-7} М	15.3±0.8
<i>B. subtilis</i> 26Д+ ЖК 10^{-7} М	38.6±1.6
ЖК 10^{-12} М	17.2±0.5
<i>B. subtilis</i> 26Д+ ЖК 10^{-12} М	9.1±1.1

Предобработка растений ЖК 10^{-12} М, также как и ЖК 10^{-7} М приводила к торможению симптомов развития болезни у инфицированных *S. nodorum* растений по сравнению с контролем (табл. 1), подтверждая положительное влияние этих двух концентраций ЖК на метаболизм растений пшеницы [13]. Интересно, что при совместной обработке растений *B. subtilis* 26Д+ЖК 10^{-12} М симптомы болезни проявлялись в меньшей степени, чем у растений обработанных только *B. subtilis* 26Д или только ЖК (табл. 1). Эти данные говорят о том, что именно низкая концентрация ЖК (10^{-12} М) в комбинации с *B. subtilis* 26Д не давала эффекта интерференции на защитную реакцию растений.

Развитие защитных реакций, несомненно, связано с индукцией транскрипционной активности генов, кодирующих определенные защитные белки [4, 5]. При разрушении клеточной стенки патогенного гриба важную роль играют гидролитические ферменты растений β -1.3-глюканазы (PR-2) и эндохитиназы (PR-3), которые часто действуют синергично [5, 14]. Растительные пероксидазы (PR-9) играют ключевую роль в защите растений от патогенов, принимая участие в синтезе антимикробных соединений и укреплении клеточной стенки растения путем формирования лигнина, что коррелирует с их устойчивостью [15].

Наибольшее количество транскриптов гена *PR-2* наблюдалось через 72 ч после инфицирования гембиотроным грибом *S. nodorum* в растениях пшеницы, обработанных ЖК ($10^{-7}M$), *B. subtilis* 26Д и при совместном применении ЖК ($10^{-12}M$) с бактерией (рис.1Б), что совпадало с повышением устойчивости растений в этих вариантах обработки. Устойчивые генотипы томатов, зараженные *Alternaria solani*, показали более высокую экспрессию β -1.3-глюканаза, по сравнению с восприимчивыми генотипами [16]. На основании литературных и наших данных можно предположить, что регуляция транскрипции данного гена осуществляется как ЖК [17], так и бактерией [3, 7]. В то же время, при совместном применении ЖК ($10^{-7}M$) и *B. subtilis* 26Д обнаружено снижение содержания транскриптов этого гена в течение всего эксперимента (рис.1А, Б), что может быть одним из проявлений интерференции сигнальных путей, снижения устойчивости у таких растений.

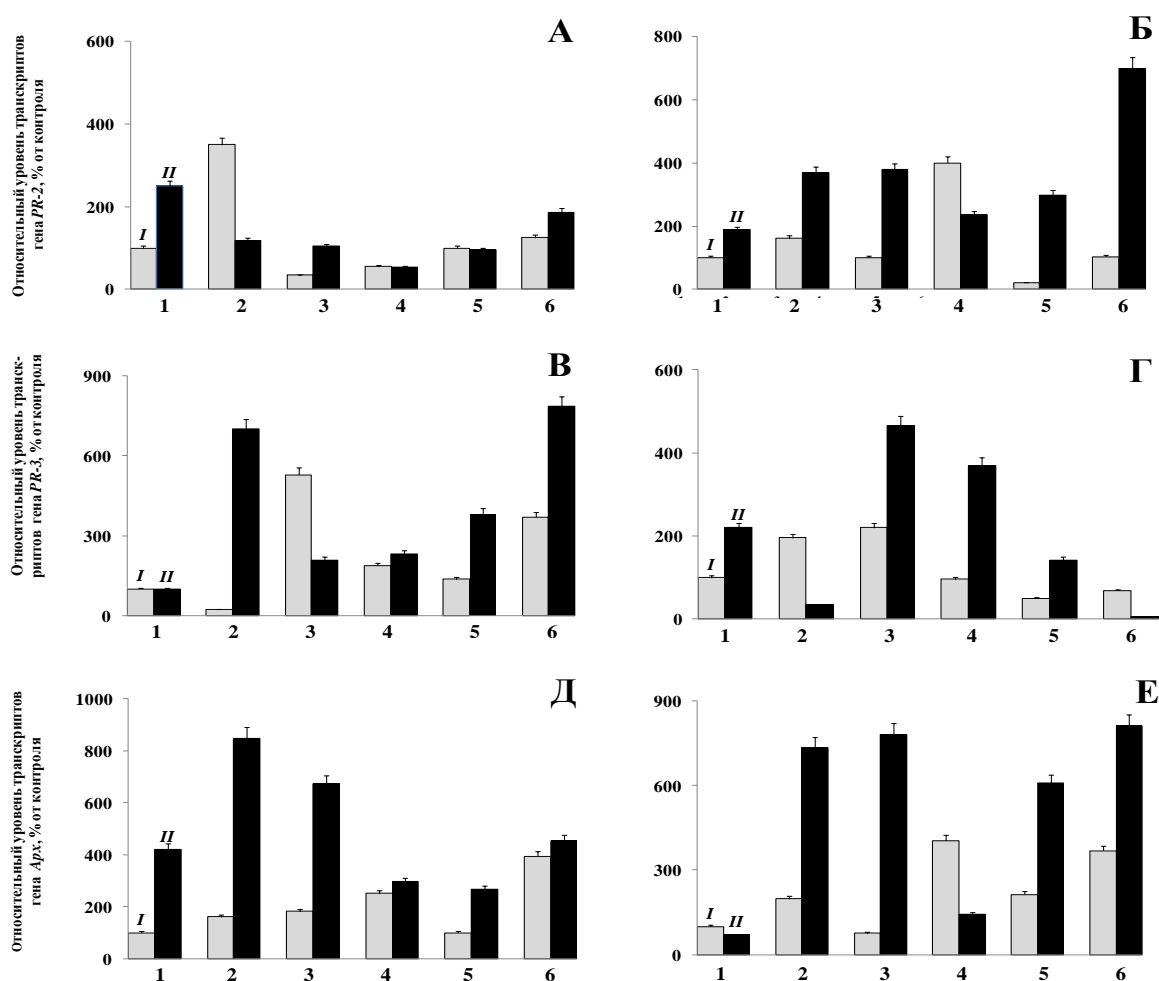


Рис. 1. Влияние жасмоновой кислоты и *B. subtilis* 26Д на накопление транскриптов генов, кодирующих β -1.3-глюканазу (*PR-2*) (А, Б), хитиназу (*PR-3*) (В, Г) и анионную пероксидазу (*Apx*) (Д, Е) в листьях пшеницы через 24 (А, В, Д) и 72 (Б, Г, Е) часа после инфицирования *S. nodorum*: 1 - вода, 2 - *B. subtilis*, 3 - ЖК $10^{-7}M$, 4 - *B. subtilis*+ЖК $10^{-7}M$, 5 - ЖК $10^{-12}M$, 6 - *B. subtilis*+ЖК $10^{-12}M$; I - контроль, II - инфицирование.

Максимальное накопление транскриптов гена *PR-3* наблюдалось через 24 ч после инфицирования в растениях предобработанных чистым штаммом *B. subtilis* 26Д и бактерией совместно с ЖК ($10^{-12}M$), но не ЖК ($10^{-7}M$), что также совпадало с

повышенной устойчивостью данных растений, а в варианте с ЖК (10^{-7} М) накопление транскриптов этого гена наблюдалось только через 72 ч после инфицирования (рис.1В, Г). Такая более ранняя активация транскрипции генов защитных белков характерна для инфицированных растений, обработанных СРРМ [7].

Индукция экспрессии гена анионной пероксидазы *Arx* в растениях пшеницы инфицированных *S. nodorum* положительно коррелировала с устойчивостью этих растений к септориозу. Так наибольшее содержание транскриптов этого гена в наших экспериментах наблюдалось в вариантах с обработкой ЖК (10^{-7} М), *B. subtilis* 26Д, ЖК (10^{-12} М) совместно с бактерией (рис.1Д, Е), из чего можно предположить, что регуляция транскрипции гена анионной пероксидазы находится не только под контролем ЖК [18], но и бактерии рода *Bacillus* [1, 19]. Однако в варианте ЖК (10^{-7} М)+бактерия наблюдалось снижение уровня транскриптов данного гена (рис.1Д, Е), что являлось еще одним проявлением интерференции сигнальных путей и коррелировало с понижением устойчивости этих растений.

Таким образом, наши данные показывают, что как предобработка растений бактериальной суспензией *B. subtilis* 26Д, так и ЖК способствует активизации защитных реакций в растениях пшеницы, связанных с повышением транскрипционной активности генов РR-белков. Однако обращают на себя внимание данные, полученные при совместной обработке растений ЖК в различных концентрациях с *B. subtilis* 26Д, показывающие концентрационную зависимость антагонистического влияния бактерии и сигнальной молекулы друг на друга, как это было показано на примере СК и ЖК [20].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №14-04-97079) и ФЦП (Госконтракт № 14.BVV.21.0063).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bargabus R.L., Zidack N.K., Sherwood J.W., Jacobsen B.J. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2002. V. 61. P. 289-298.
2. Van Loon L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria // *Eur. J. Plant Pathol.* 2007. V. 119. P. 243-254.
3. Hyakumachi M., Nishimura M., Arakawa T., Asano S., Yoshida S., Tsushima S., Takahashi H. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato // *Microbes Environ.* 2013. V. 28(1). P. 128-34.
4. Pieterse C.M., Leon-Reyes A., Van Ent S., Van Wees S. Networking by small-molecules hormones in plant immunity // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. P. 308-316.
5. Van. Loon L., Rep M., Pieterse C.M. Significance of Inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135-162.
6. Ahn I.P., Lee S., Kim M.G., Park S.R., Hwang D. Priming by rhizobacterium protects tomato plants from biotrophic and necrotrophic pathogen infections through multiple defense mechanisms // *Mol Cells.* 2011. V. 32(1). P. 7-14.
7. Ahn I.P., Lee S.W., Suh S.C. Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1 // *Mol Plant Microbe Interact.* 2007. V. 20(7). P. 759-68.
8. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Взаимодействие салицилат- и жасмонат-индуцируемых сигнальных путей в развитии устойчивости картофеля к фитофторозу с участием гена пероксидазы M21334 // *Физиол. растений.* 2014. Т. 61(4). С. 522-528.
9. Бурханова Г.Ф., Яруллина Л.Г., Максимов И.В. Пути регуляции хитоолигосахаридами защитных реакций в растениях пшеницы при инфицировании *Bipolaris sorokiniana* // *Физиология растений.* 2007. Т. 54. С. 119-126.

10. Chen L., Zhang Z.Y., Liang H.X., Liu H.X., Du L.P., Xu H., Xin Z. // J. Exp. Bot. 2008. V. 59(15). P. 4195-4204.
11. Giménez M.J., Pistón F., Atienza S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae // Planta. 2011. V. 233(1). P. 163-73.
12. Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Черепанова Е.А., Заикина Е.А., Максимов И.В. Салициловая и жасмоновая кислоты в регуляции про-/антиоксидантного статуса пшеницы при инфицировании грибом *Septoria nodorum* Berk. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. N 5. С. 602-608.
13. Сахабутдинова А.Р., Ласточкина О.В., Шакирова Ф.М. Влияние метилжасмоната на рост и гормональный статус проростков пшеницы // Агрехимия. 2009. N 7. С.48-53.
14. Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi // Biotechnol Lett. 2012. V. 34. P. 1983-1990.
15. Almagro L., Gomez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcello A., Pedreno M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions // J. Exp. Botany. 2009. V. 60. P. 377-390.
16. Salim A., Saminaidu K., Marimuthu M., Perumal Y., Rethinasamy V., Palanisami J. Defense responses in tomato landrace and wild genotypes to early blight pathogen *Alternaria solani* infection and accumulation of pathogenesis-related proteins // Arch. Phytopathol. Plant. Prot. 2011. V. 44. P. 1147-64.
17. Seo S, Seto H, Yamakawa H, Ohashi Y. Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in *Tobacco mosaic virus*-infected tobacco leaves // Mol. Plant-Microbe Interact. 2001. V. 14. P. 261-264.
18. Kumari G.J., Reddi A.M., Naik S.T., Kumar S.G., Prasanthni J. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings // Biologia plantarum. 2006. N 50. P. 219-226.
19. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф. Регуляция пероксидазной активности под влиянием сигнальных молекул и *Bacillus subtilis* 26Д в инфицированных *Phytophthora infestans* растениях картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50(2). С. 197–202.
20. Leon-Reyes A., Spoel S.H., De Lange E., Abe H., Kobayashi M., Tsuda S., Millenaar F., Welschen R., Ritsema T., Pieterse C.M. Ethylene modulates the role of nonexpressor of pathogenesis-related genes1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling // Plant Physiol. 2009. V. 149(4). P. 1797-809.

УДК 632.913:633.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКТИНОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ БИОРЕГУЛЯТОРОВ И В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ОНТОГЕНЕЗА

Газизова Г. Ч., Ситдикова Г. И., Зайцева К. П., Ямалеева А. А.

Башкирский Государственный Университет, г.Уфа, Россия

В настоящее время на рынок поступает много биопрепаратов и регуляторов роста, повышающих урожайность сельскохозяйственных культур, усиливающих устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды, в том числе к болезням. Единого центра, позволяющего провести сравнительную оценку эффективности биопрепаратов и регуляторов роста по конечному результату – урожайности в разрезе культур в России нет.

Изучались различные технологии применения биопрепаратов и регуляторов роста, определялась урожайность культуры, повышение урожайности. Препараты получали от разработчиков – научно-исследовательских институтов и непосредственно производителей, применяя их по нормам расхода в соответствии с рекомендациями.

Результаты опытных вариантов сравнивали в одном случае с эталоном, в другом – с контролем [1].

На основании проведенных работ можно заключить, что большинство испытанных препаратов (биологические средства защиты растений, регуляторы роста и развития растений, жидкие удобрения для применения в период вегетации), разработанные в научно-исследовательских учреждениях повышают урожайность овощных культур. Дополнительно надо уточнить для какой культуры лучше подходит тот или иной препарат в нашей зоне, а также их влияние на подавление возбудителей болезней растений [2].

Нами проведены исследования по совершенствованию принципов роста и защиты посевов овощных культур, предусматривающих использование регуляторов роста на разных этапах развития растений.

Наши опыты показали, что предпосевная обработка семян *Daucus carota* многоцелевыми регуляторами роста (Биодукс, Биодуслект) оказывает положительное влияние на урожай и биохимический состав корнеплодов и зеленой массы моркови. Содержание белка в созревших корнеплодах столовой моркови возросло на 1,5% и повысилась гемагглютинирующая активность лектинов. Лектины участвуют в упаковке запасных белков в алейроновых зернах, а также регулируют последовательность вовлечения запасных белков при прорастании семени [3].

Интенсивность синтеза лектинов зависит от активности иРНК в ядрах, кодирующих синтез этих белков. Количественный анализ лектинов в корнеплодах и листьях, выращенных из обработанных семян регуляторами Биодукс и Биодуслект показал, что ГА лектинов в процессе онтогенеза повышается (табл.1).

Таблица 1

Влияние регуляторов роста на ГА лектинов корнеплодов, листьев и зрелых семян
Daucus carota (ЕА/мг сухого веса).

Варианты обработки семян	Корнеплоды	Листья	Созревшие семена
Контроль	26,2 ± 1,2	15,7 ± 1,1	29,2 ± 1,3
Иммуноцитифит (эталон)	27,1 ± 1,3	15,9 ± 1,2	30,5 ± 1,4
Биодукс	29,3 ± 1,2	16,5 ± 1,5	32,6 ± 1,6
Биодуслект	30,2 ± 1,4	16,8 ± 1,5	35,3 ± 1,7

Как видно по данным таблицы 2 на вариантах с регулятором роста Иммуноцитифит, который выбран как эталон, мы также наблюдали улучшение посевных качеств семян, но они были математически достоверно ниже вариантов с препаратом Биодуслект, энергия прорастания для моркови составила 83%, всхожесть 95%. Кроме контрольных семенных исследований мы определяли также полевую всхожесть. В полевых условиях Биодуслект обеспечил более интенсивное прорастание семян. Это, вероятно, происходит за счет усиления ростовых процессов у ослабленных семян.

Таблица 2

Влияние регуляторов роста растений на всхожесть и энергию прорастания семян
 столовой моркови

Варианты опыта по схеме	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	
		Лаб.	Пол.
Контроль	76	91	71
Иммуноцитифит	79	93	75
Биодукс	83	95	76
Биодуслект	82	95	76

Нами также были проведены исследования по изучению ГА лектинов и хроматографического фракционирования лектинов методом афинной хроматографии на овогеле.

Было выявлено, что РГА с кровью петуха с лектинами корней *Arctium lappa*, собранных в разные сезонные месяцы, дает схожие реакции.

РГА лектинов корней *Arctium lappa*, собранных в разные сезонные месяцы, с эритроцитами II группой крови человека дает положительный результат в соотношении 1:6, а с эритроцитами III группы – 1:7. Отрицательная реакция объясняется не связыванием лектинов с эритроцитами или меньшей их концентрацией, достаточной для визуальной идентификации.



Рис. 1. Хроматографические профили лектинов из корней раннего периода вегетации растений.



Рис. 2. Хроматографические профили лектинов позднего периода вегетации корней.

Изучение растворимых белков и лектинов корней *Arctium lappa*, собранного в разные периоды вегетации, наблюдается два пика показателей. Первый скачок свидетельствует о наибольшем содержании растворимых белков в растворе, второй – о наибольшем содержании лектинов (рис. 1 и рис.2).

Таблица 3

Содержание лектинов в корнях лопуха в зависимости от времени сбора материала

Время заготовки материала	Содержание лектинов
Май	0,15±0,03
Июнь	0,13±0,02
Август	0,09±0,03
Октябрь	0,07±0,02

Таким образом, согласно таблице 3, количественный состав лектинов корней лопуха и их активность в ранние периоды значительно выше. Такие же результаты были

получены при исследовании лектинов *Pleurotus ostreatus*. Это позволяет предположить целесообразность использования *Árctium lappa* в ранние периоды онтогенеза, что и подтверждается данными народной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алабушев В.А. Растениеводство. Ростов-на-Дону: изд. «МарТ», 2001. С. 205-206.
2. Алексейчук Г.Н., Реуцкий В.Г. Способы индукции стрессоустойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Академия, 1998. С. 106-111.
3. Ямалеева А.А., Сахибгареев А.А., Ямалеев А.М. Геномный анализ иммунитета и фито-защита. ISBN 978-5-9613-0256-1. Уфа, КП РБ изд. «Мир печати», 2013. С 256.

УДК 573.6: 579.844

ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИИ *FISCHERELLA MUSCICOLA* (THUR.) GOM.

¹Горностаева Е.А., ^{1,2}Домрачева Л.И., ¹Ковина А.Л., ¹Трефилова Л.В.

¹Вятская государственная сельскохозяйственная академия, г. Киров, Россия

²Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

В настоящее время значительное количество микроорганизмов различной систематической принадлежности широко используется в практике сельского хозяйства, а также в биоремедиационных мероприятиях при восстановлении техногенно нарушенных территорий. Большинство биопрепаратов готовят на основе штаммов сапротрофных бактерий и микроскопических грибов. Значительна уже область использования цианобактерий (ЦБ). В то же время именно ЦБ обладают уникальными особенностями, позволяющими считать эту группу организмов наиболее перспективными объектами биотехнологии. Помимо того, что многие ЦБ сочетают в себе одновременную способность к кислородному фотосинтезу и азотфиксации, они обладают способностью к биосорбции тяжелых металлов (ТМ), в качестве экзометаболитов выделяют биологически активные вещества ростстимулирующей и антагонистической направленности [1-2; 9].

Скрининг ряда почвенных ЦБ, выделенных в чистую культуру на кафедре биологии растений, селекции и семеноводства ВятГСХА, показал, что все вышеперечисленные способности ЦБ присущи нескольким видам р. *Nostoc*: *N. linckia*, *N. paludosum*, *N. muscorum* [5; 8; 10].

Естественно предположить, что подобные свойства характерны и для других родов ЦБ. Так, в серии лабораторных опытов, проведенных на кафедре в последнее время, было показано, что ЦБ *Fischerella muscicola* (Thur.) Gom, недавно выделенная из почвы в чистую культуру, обладает большей скоростью накопления биомассы при росте в непрерывной культуре и более длительный срок сохраняет биологическую активность, а также ярче проявляет антагонистические способности по отношению к фитопатогенным грибам р. *Fusarium*, по сравнению с ЦБ р. *Nostoc* [3; 4; 6].

Цель данной работы – изучить возможность использования ЦБ *Fischerella muscicola* в качестве стимулятора роста при выращивании бобовых культур и в качестве компонента циано-ризобияльного комплекса при проведении фиторемедиационных мероприятий на почвах, загрязненных ТМ.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования была альгологически чистая культура ЦБ *Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. шт. 300, выделенная из дерново-подзолистой почвы, которую использовали для инокуляции семян лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) – в 1-й серии опытов, и горчицы белой (*Sinapis alba* L.) – во 2-й серии опытов. Культуру ЦБ выращивали на безазотистой среде Громова № 6 в течение 3-х недель в люминостате при постоянной температуре (+25° С) и освещении 3000 лк. Инокулят для лядвенца довели до титра $2 \cdot 10^7$ кл./мл, а для горчицы – до $8 \cdot 10^8$ кл./мл. Перед посевом семена предварительно замачивали в инокуляте на 12 часов.

В 1-й серии опытов изучали влияние *Fisch. muscicola* на интенсивность образования клубеньков у лядвенца рогатого и накопление сухой массы растений в процессе вегетации при совместном использовании с *Rhizobium loti* Jarvis et al.

Во 2-й серии опытов изучали влияние цианобактериальной обработки семян горчицы белой, посеянных в почву с искусственным внесением меди в виде соли ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в концентрациях 3, 150 и 300 мг/кг (что соответствует 1, 50 и 100 ПДК для почвы), на интенсивность выноса меди растением. Водные растворы поллютанта вносили в почву после посева семян, проливая 10-15 см верхнего горизонта. Уборку урожая горчицы белой проводили через 11 недель после посева. Содержание меди в почве, в семенах и вегетативной массе горчицы определяли по методике [7].

Результаты и обсуждение

Влияние *Fischerella muscicola* на развитие лядвенца рогатого

Определение интенсивности образования клубеньков на корнях лядвенца рогатого, а также урожай сухой массы растений определяли через полтора месяца после посева семян в почву в стадии бутонизации и начала цветения. С этой целью растения выкапывали, корни тщательно очищали от почвы и просчитывали количество клубеньков (табл. 1). В каждом варианте отбирали по 30 растений.

Таблица 1

Влияние ризобии-цианобактериальной инокуляции на интенсивность образования клубеньков на корнях лядвенца рогатого

Вариант	Количество клубеньков, шт./1 растение	Количество растений с клубеньками, %
1. Контроль (без обработки)	0,67±0,04	43,3
2. <i>Rhizobium loti</i>	1,23±0,04	66,7
3. <i>Fischerella muscicola</i>	1,97±0,41	90,0
4. <i>Rhizobium loti</i> + <i>Fischerella muscicola</i>	7,10±0,55	100,0

Полученные результаты показывают, что почва очень бедна дикими расами *Rh. loti*: степень нодуляции в контрольном варианте достигает всего 43%. Это вполне объяснимо тем, что в дикой флоре Кировской области лядвенец рогатый является эпизодическим растением и поэтому среди ризобиев-аборигенов мало штаммов, специ-

фичных для лядвенца. Обработка семян *Rh. loti* повышает как степень нодуляции (до 66,7%), так и количество клубеньков на корне (в 2 раза). Самым эффективным оказался вариант с одновременной обработкой семян ризобием и фишереллой: количество клубеньков в среднем на 1 корень более, чем на порядок превышает данный показатель в контроле, при этом образование клубеньков происходит на корнях всех растений, в отличие от контроля, где растения с клубеньками на корнях составляют менее 50%.

Определение ксеромассы надземной части лядвенца рогатого, отобранного с 1 м², показало, что урожай сухой массы выше во всех вариантах с предварительной бактериальной обработкой семян и достигает максимальной величины при цианоризобиальной инокуляции (табл. 2).

Таблица 2

Влияние инокуляции семян лядвенца рогатого на урожай

Вариант	Ксеромасса надземной части, г/м ²	Процент к контролю
1. Контроль (без обработки)	45,19	100
2. <i>Rhizobium loti</i>	60,27	+33,37
3. <i>Fischerella muscicola</i>	60,64	+34,20
4. <i>Rhizobium loti</i> + <i>Fischerella muscicola</i>	79,81	+76,73

Таким образом, рекогносцировочные опыты, в которых обработка семян впервые проведена с использованием нового штамма ЦБ *Fisch. muscicola*, показывают перспективность дальнейшей разработки комплексного ризобιο-цианобактериального препарата, предназначенного для увеличения продуктивности лядвенца рогатого.

Влияние *Fischerella muscicola* на вынос ионов меди из почвы горчицей белой

Определение содержания меди в надземной массе горчицы белой показало, что предпосевная инокуляция семян *Fisch. muscicola* оказывает неоднозначное действие на накопление этого элемента растением. До концентрации меди при внесении в почву 150 мг/кг фишерелла выступает в качестве защитного агента, снижающего уровень поступления иона ТМ в растение. При самой высокой испытанной концентрации ионов меди (300 мг/кг при внесении) *Fisch. muscicola* существенно (в 1,5 раза) повышает уровень извлечения меди из почвы растением (табл. 3).

Таблица 3

Влияние обработки семян *Fischerella muscicola* на вынос ионов меди из почвы горчицей белой

Концентрация ионов меди в почве (мг/кг)	Содержание меди в надземной части растений (мг/кг)	
	Без обработки семян	Семена с обработкой
3 (1 ПДК)	6,3±1,4	5,6±2,2
150 (50 ПДК)	7,0±1,6	6,4±1,5
300 (100 ПДК)	5,7±1,3	8,7±2,1

При этом в вариантах без предпосевной цианобактериальной инокуляции семян не наблюдается строгой закономерности между содержанием меди в почве и накоплением её в растении. В то же время в вариантах с предпосевной обработкой семян *Fisch. muscicola* прослеживается прямая корреляционная зависимость между концентрацией меди в почве и в растении.

Вероятно, в дальнейшем комплекс горчица белая + *Fisch. muscicola* можно использовать при разработке мероприятий по фиторемедиации почв с высоким содержанием меди.

Таким образом, первые полевые опыты с использованием предпосевной инокуляции семян ЦБ *Fisch. muscicola* показали, что данный вид ЦБ представляет значительный интерес как перспективный биотехнологический объект для создания биопрепарата полифункционального действия, который возможно использовать в агротехнологиях для повышения продуктивности бобовых культур и в биоремедиационных мероприятиях для создания фито-цианобактериальных комплексов для очистки почвы от ТМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Potential applications of blue algae [Текст] / Н. Chakdar, S.D. Jadhav, D.W. Dhar, S. Pabbi // Journal of Scientific & Industrial Research. – 2012. – Vol. 71. – P. 13-20.
2. Андреев, Е.И. Цианобактерии [Текст] / Е. И. Андреев, Ж. П. Коптева, В.В. Занина. – Наукова думка, 1990. – С. 200.
3. Горностаева, Е.А. Влияние цианобактериальной обработки семян на уровень накопления ионов меди (II) в пшенице [Текст] / Е.А. Горностаева, Н.А. Кудряшов, А.А. Калинин // Знания молодых: наука, практика и инновации: матер. Международ. научно-практич. конф. аспирантов и молодых ученых. – Киров: ФГБОУ ВПО Вятская ГСХА, 2014. – С. 16-18.
4. Домрачева, Л. Фузари: биологический контроль, сорбционные возможности [Текст] / Л. Домрачева, Л. Трефилова, А. Фокина. – Германия: Изд-во LAP LAMBERT Academic Publishing, – 2013. – С. 181.
5. Домрачева, Л.И. «Цветение» почвы и закономерности его развития [Текст] / Л.И. Домрачева – Сыктывкар, 2005. – 336 с.
6. Защитное действие цианобактерий при выращивании горчицы в условиях загрязнения почвы ионами меди (II) [Текст] / Е.А. Горностаева, А.А. Калинин, Е.В. Зыкова, Н.А. Кудряшов // Бизнес. Наука. Экология родного края: проблемы и пути их решения: матер. Всерос. научно-практич. конф.-выставки с междунар. участием. – Киров, 2013. – С. 236-239.
7. Методика выполнения измерений массовых долей токсичных металлов в пробах почв атомно-абсорбционным методом. ФР.1.31.2007.04106 [Текст]. – М. – 2007. – С. 13.
8. Методология изучения влияния ионов тяжёлых металлов на культуры почвенных цианобактерий [Текст] / А. И. Фокина, Ю. Н. Зыкова, Д.Н. Данилов, Т. Я. Ашихмина, М.С. Жмак // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 3. – С. 21–27.
9. Панкратова, Е.М. Становление функциональных особенностей цианобактерий на путях их сопряженной эволюции с биосферой [Текст] / Е.М. Панкратова // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – №3. – С. 4-11.
10. Реакция различных видов цианобактерий рода *Nostoc* на действие токсикантов [Текст] / С.Ю. Огородникова, Ю.Н. Зыкова, Г.И. Березин, Л.И. Домрачева, А.А. Калинин // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах: Матер. Междунар. научно-практич. Конф., посвящ. 100-летию со дня рождения проф. Э.А. Штиной. – Киров, 2010. – С. 216–221.

УДК 577.151

**EFFECT OF EXTRACTS FROM BIRCH TREE BARK, CHINA TEA AND THE ROOT OF CACTUS
Opuntia ficus-indicata ON α -AMYLASE ACTIVITY**

Radik Zaynullin¹, Roberto Arredondo-Valdés², Anna Ilyina^{2*}, Elda Patricia Segura-Ceniceros², José Luis Martínez-Hernández², Rayhana Kunakova¹

¹Ufa State University of Economics and Service

²Nanobioscience group, Chemistry School, Autonomous University of Coahuila

Abstract

In vitro effect of extracts from *Betula pendula* Roth bark, china tea, *Opuntia ficus-indicata* root on alpha-amylase activity was compared with acarbose inhibitory effect. Acarbose is used as pharmacological treatment to control of postprandial glucose in diabetic patients. The similar inhibition was observed for watery extract of *Opuntia ficus-indicata* root and medicine, while other extracts were characterized by less inhibitory effect. The kinetic competitive mechanism of inhibition was demonstrated for watery suspension of extracts obtained after solvent evaporation from watery and ethanolic infusions of *Opuntia ficus-indicata* root using Dixon and Cornish-Bowden coordinates.

Introduction

Recently, diabetes mellitus has increased at an alarming rate and is now a worldwide health problem. Different pharmacological treatments were developed to control the hyperglycemia. The inhibition of amylase and other glucosidases is one of the pharmacological targets for design of new treatments. For example, acarbose (oligosaccharide obtained using bacteria *Actinoplanes utahensis*) used to treat type 2 diabetes and prediabetes [1].

The plants are considered as carriers of physiologically active substances that may be applied to development of new medicines as well as to preparation of functional food and drinks that may be applied for control of different diseases, for example diabetes mellitus. Thus, phaseolamina (45 kDa glycoprotein) is derived from *Phaseolus vulgaris* plant and shows effects in hyperglycemia and obesity control [2, 3].

The goal of the present study was to compare *in vitro* effect of extracts from *Betula pendula* Roth bark, china tea, *Opuntia ficus-indicata* root on alpha-amylase activity with acarbose inhibitory effect and to define kinetic mechanism of inhibition for extracts with higher inhibitory activity.

Materials and Methods

Samples of raw materials were purchased in health food stores of Saltillo and Ufa, while Pu-erh tea was provided by Zhang Qi (China). Photographic presentation of natural sources used for extracts preparation and names of plant spices are presented in the Figure 1.

Extract from *Betula pendula* Roth bark was prepared according the technique described previously [4], in which isopropanol-water (9:1 v/v) mixture was applied as an extractant.

Watery extraction from Pu-erh leaves and cactus root samples was carried out at 25°C and 120 rpm for 5 h in a ratio of 10:1 (solvent / plant sample, mL / g). Ethanolic extract from cactus root was prepared under same conditions using 70% ethanol. After filtration the solvents were evaporated. *In vitro* test of amylase (Sigma-Aldrich Co.) inhibition was performed using watery suspension of dried extracts according the spectrophotometric method de-

scribed previously [4] in the presence of starch (1%) as substrate by means of reducing sugars detection.

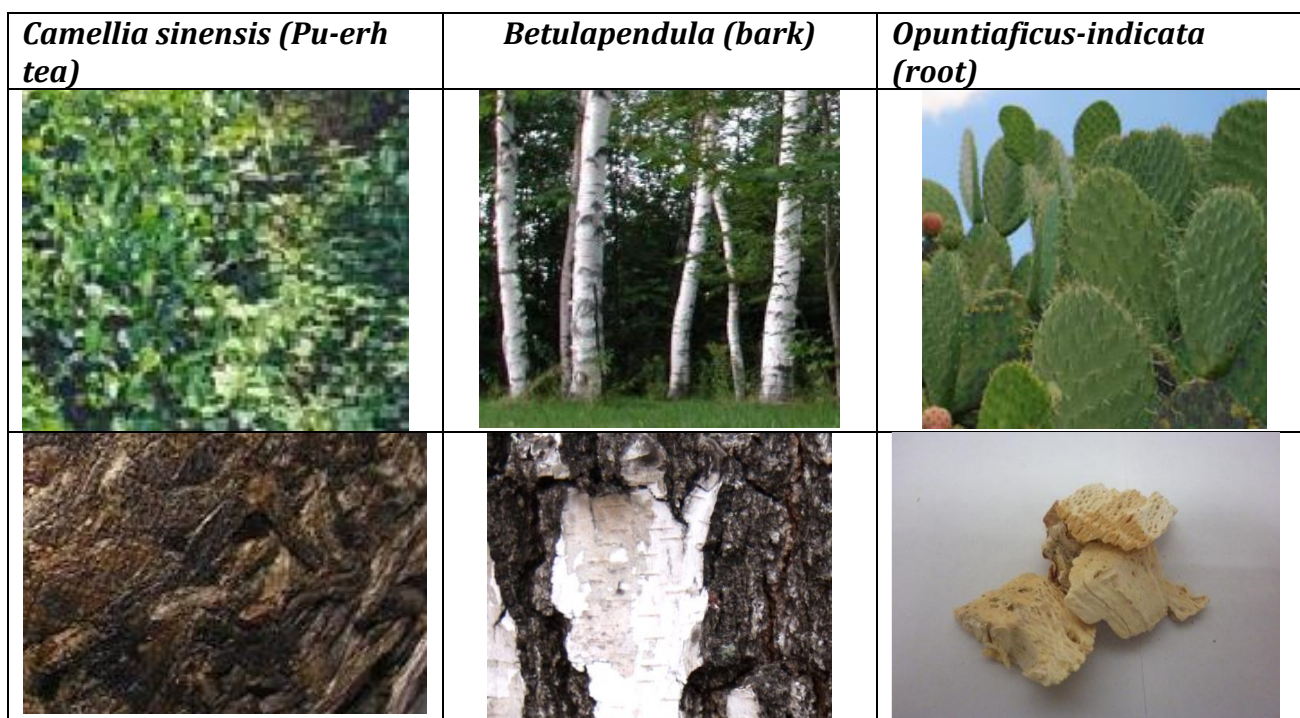


Figure 1. Photographic presentation of natural sources used for extracts preparation.

Results and Discussion

The Figure 2 describes the inhibitory effect of acarbose and studied extracts on amylase activity as the function of their concentration. All extracts applied in assay showed the inhibition of amylase. Table 1 shows the IC₅₀ values estimated from curves of Figure 1.

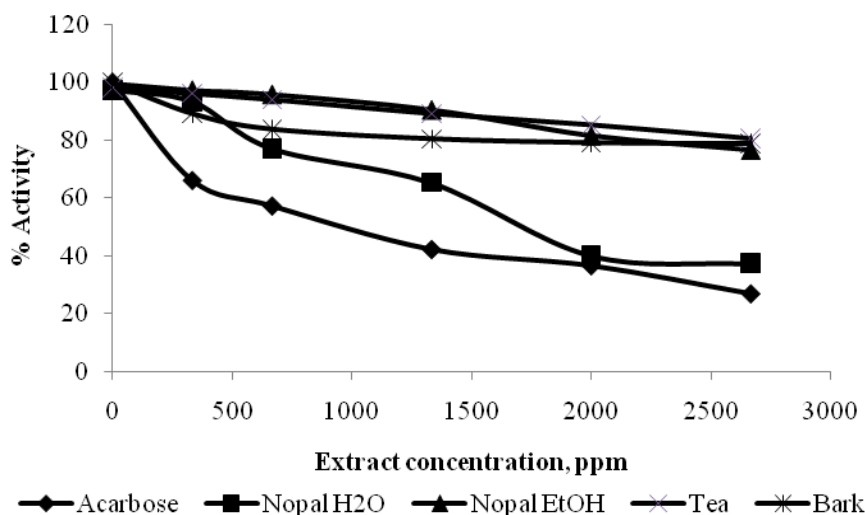


Figure 2. Effect of different concentrations of acarbose and plant extracts on amylase activity under saturated substrate concentration. (Standard deviations were less than 2%).

The watery extract of *Opuntiaficus-indicata* root was characterized by higher inhibitory activity in comparison with others, which was similar to observed in the presence of acarbose. In the case of extract from *Betula pendula* Roth bark, at concentrations higher 1000 ppm sig-

nificant increase of inhibitory activity was not observed, while tea and ethanolic extracts samples maintained the tendency to decrease amylase activity. These differences may be related with limited solubility of extract from *Betula pendula* Roth bark in water [4] that is not observed for other extracts.

Table 1.

Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) inhibitory estimated form the curves of Figure 2.

Sample	IC_{50} , ppm
Acarbose	800
Bark extract	3497
Watery cactus extract	1875
Ethanolic cactus extract	3029
Watery tea extract	7213

The Figure 3 shows the Dixon and Cornish-Bowden coordinates applied to define inhibition mechanism. The lineal functions were obtained in both cases: intercepted in “ $1/V$ against Extract concentration” coordinates and paralel in “ S/V agasinst Extract concentration” coordinates.

These results correspond to competitive inhibition mechanism, so the intersection in the Dixon plot is given by abscissa equal to $(-K_i)$ and ordinate equal to $1/V_{max}$ [5, 6]. Calculated kinetic parameters are: K_m equal to 0.6 mg/mL, V_{max} equal to 2.1 mM/min from Dixon coordinates; K_i equal to 6007 ± 240 mg/mL. This value was twice higher that detected for betulin-containing extract from *Betula pendula* Roth bark [4] similar to applied in the present study. In both cases reaction mechanisms involved in the inhibition of α -amylase is related to competition between substrate and inhibitor for enzyme active center.

The presence of α -amylase inhibitors in plants was described previously [7]. It is well known that amylase inhibitors form a part of defense system of plants against pathogens (insects and microorganisms) [7] to impede digestion of plant starch a through their action on digestive α -amylases. Six different α -amylase inhibitor classes could be used in pest control (lectin-like, knottin-like, cereal-type, Kunitz-like, c-purothionin-like and thaumatin-like) [7].

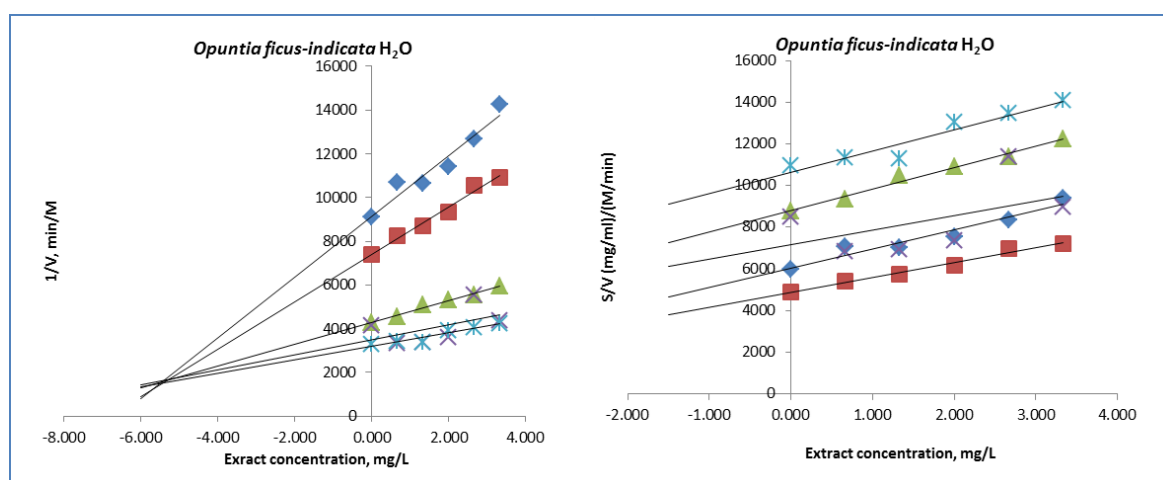


Figure 3. Dixon (Left) and Cornish-Bowden (Right) coordinates applied to define inhibition mechanism and K_i value for watery extract obtained from cactus root. (Lineal functions relate to different starch concentrations: 0.66, 1.27, 2.05 mg/mL, 2.7 mg/mL, and 3.3 mg/mL, respectively).

Moreover, plants are important source of chemical constituents with potential for inhibiting α -amylase and can be used as therapeutic or functional food sources. These inhibitors are considered as a strategy for the treatment of disorders in carbohydrate uptake, such as diabetes and obesity, as well as dental caries and periodontal diseases [8]. Data shown that human consumption includes between 200 and 400 g of carbohydrates per day, of which about 60% as starch; excessive consumption of it has been associated with overweight and obesity[9]. This may be considered as the evidence the importance of describing of new sources of α -amylase inhibitors. The use of inhibitors of amylase is based on the fact that enzyme inhibition resulting in reduced weight and a reduced level of postprandial glucose levels in patients with diabetes due to undigested starch does not provide glucose and calories because it is lost in the stools [10, 11]. Ethnopharmacology today reported more than 1200 plants used in traditional medicine for the treatment and regulation of glucose-lowering activity [11]. It is important to define the mechanisms behind these effects are to propose their appropriate use as treatment or source of active ingredients.

In the present study three potential sources of alpha-amylase inhibitors were characterized for their inhibitory capacity demonstrating that the *Opuntia ficus-indicata* root contains competitive inhibitors of enzyme.

REFERENCES

1. Scheen A.J. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. //Diabetes and Metabolism.1998. 24(4). 311-320.
2. Díaz B.E., Aguirre P.C., Gotteland R. M. Effect of an α -amylase inhibitor on body weight reduction in obese women. //Revista Chilena de Nutrición.2004. 31(3) <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182004000300006>
3. Wiedeman M.A., Ochoa O.E., Maury S.E., Gotteland M. 2011. Use of dietary supplements for the management of overweight and obesity: a review of the evidence.//Revista Chilena de Nutrición.2011. 38(2). 234-242.
4. Ilyina A., Arredondo-Valdés R., Farkhutdinov S., Segura-Ceniceros E.P., Martínez-Hernández J.L., Zaynullin R., Kunakova R. Effect of betulin - containing extract from birch tree bark on α -amylase activity in vitro and on weight gain of broiler chickens in vivo.//Plant Foods for Human Nutrition.2014.69.65–70.
5. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants.//Biochemical Journal.1953. 55. 170-171.
6. Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors.// Biochemical Journal. 1974. 137.143-144
7. Franco O.L., Rigden D.J., Melo F.R., Grossi-de-Sá M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection.//European Journal of Biochemistry.2002. 269. 397-412.
8. Michelle de Sales P., Monteiro de Souza P., Simeoni L.A., de Oliveira Magalhães P., Silveira D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source.// Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. 2012. 15(1). 141-183.
9. Merchant A., Vatanparast H., Barlas S., Dehghan M., Ali Shah S., De Koning L. Carbohydrate intake and overweight and obesity among healthy adults. Journal of the American Dietetic Association. 2009. 109. 1165-1172.
10. Yeh G. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes.//Diabetes Care. 2003.26. 1277-1294.
11. Kesari A.N., Kesari S., Santosh K.S., Rajesh K.G., Geeta W. Studies on the glycemic and lipidemic effect of *Murrayakoenigii* in experimental animals.//Journal of Ethnopharmacology. 2007. 112(2). 305-311.

УДК 635.92:581.143.6

МОРФОГЕНЕЗ *DIGITALIS GRANDIFLORA* MILL. IN VITRO

Зарипова А.А., Ахметова А.Ш., Мухаметвафина А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический сад-институт Уфимского научного центра
Российской академии наук, г.Уфа, Россия

Наперстянка крупноцветковая (*Digitalis grandiflora* Mill.), семейство норичниковых (*Scrophulariaceae*) – травянистый многолетник и находит широкое применение в медицинской практике. Лекарственным сырьем являются листья. В листьях содержатся биологически активные вещества: 23 сердечных гликозида, флавоноиды, стероидные сапонины, фенолкарбоновые кислоты, антрахиноны, дубильные вещества, иридоиды, следы алкалоидов и минеральные соли. Главными действующими началами являются гликозиды гитоксин и дигитоксин. Препараты из листьев наперстянки применяют как средство, регулирующее сердечную недостаточность и повышающее кровяное давление.

Возрастающая потребность в сырье *D. grandiflora*, запасы которой быстро истощаются в природных местообитаниях из-за интенсивной нерегулируемой заготовки [2], не может быть удовлетворена только возобновлением естественных зарослей. Клональное микроразмножение в культуре тканей является перспективным методом вегетативного размножения лекарственных растений.

Цель данной работы – изучение особенностей морфогенеза *D. grandiflora* в культуре тканей при клональном микроразмножении.

Одним из ключевых моментов клонального микроразмножения является разработка приемов введения растительного материала в стерильную культуру. При изучении асептических линий в качестве исходного материала использовали семена. Поверхностную стерилизацию проводили согласно общепринятым методикам с использованием в качестве стерилизующих агентов ртуть- и серебросодержащие соединения [1]. Семена сначала стерилизовали в 70% этаноле, а затем в одном из следующих дезинфицирующих растворов: перекись водорода, диацид и нитрат серебра. Использованные стерилизующие растворы по-разному влияли на жизнеспособность семян и последующее развитие проростков. Стерилизация семян *D. grandiflora* в 3% растворе перекиси водорода снижала их жизнеспособность по сравнению с 0,1% раствором диацида и 0,2% раствором нитрата серебра. Максимального числа жизнеспособных (69,8%) и минимального числа инфицированных (2,0%) семян удалось достичь при последовательном выдерживании семян в 70% этаноле в течение 1 мин и 0,1% растворе диацида в течение 5 мин (табл. 1). Наибольшая инфицированность и низкая жизнеспособность выявлена у семян, стерилизованных в вариантах с использованием перекиси водорода и нитрата серебра.

Таблица 1

Влияние стерилизующих растворов на жизнеспособность семян
Digitalis grandiflora в культуре *in vitro*

Стерилизующий раствор, экспозиция	Число инфицированных, %	Число жизнеспособных, %	Число некротизированных, %
70% этанол – 1 мин 0,1% диацид – 5 мин	2,0	69,8	28,2
70% этанол – 1 мин 3% H ₂ O ₂ – 15 мин	58,2	21,3	20,5
70% этанол – 1 мин 0,1% диацид – 3 мин	21,8	57,6	20,6
70% этанол – 1 мин 0,2% AgNO ₃ – 8 мин	46,3	38,0	15,7

Экспланты культивировали при температуре 25°C, 16-часовом фотопериоде, на безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) [3] в течение 30-40 дней. Полученные проростки фрагментировали на семядольный узел, гипокотиль. В опытах с эксплантами *D. grandiflora* для органогенеза и каллусогенеза в питательную среду добавляли цитокинины и ауксины, оптимальная концентрация которых была установлена экспериментально. Были использованы шесть вариантов питательной среды MS (табл. 2). В течение первых 10-14 суток во всех вариантах опыта наблюдали набухание тканей и увеличение размеров эксплантов по сравнению с исходным. Прямого органогенеза у этих эксплантов не наблюдалось. На семядольном узле и гипокотиле параллельно с процессами увеличения эксплантов в размерах наблюдалось образование плотного морфогенного каллуса с зернистой структурой, чему предшествовало утолщение по месту среза ткани.

Таблица 2

Влияние регуляторов роста на каллусогенез
 эксплантов *Digitalis grandiflora*

Концентрация регуляторов роста, мг/л					Интенсивность образования каллуса, %	
2,4-Д	Кинетин	НУК	БАП	ИУК	на семядольном узле	на гипокотиле
0,5					28,4 ± 1,2	17,1 ± 0,6
0,5	0,2				49,0 ± 1,3	48,6 ± 1,1
	0,2	1,0			57,7 ± 1,0	56,4 ± 0,9
	0,5	2,5			73,2 ± 2,6	76,0 ± 1,5
			2,0	1,0	73,6 ± 0,6	74,3 ± 2,4
		1,0	2,5		87,4 ± 1,9	81,6 ± 1,7

В таблице 2 показана индукция каллусообразования на сегментах семядольного узла и гипокотиле в зависимости от состава и концентрации регуляторов роста в питательной среде. Наибольшее образование каллуса было получено на эксплантах, куль-

тивируемых на питательной среде, содержащей 2,5 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК (на семядольном узле – 87,4% и гипокотиле – 81,6%); 2,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л ИУК (73,6 и 74,4% соответственно); 0,5 мг/л кинетин + 2,5 мг/л НУК (73,2 и 76,0%). Эффективность пролиферации побегов из каллуса семядольного узла и гипокотиля в зависимости от гормонального состава питательной среды через 1,5 месяца культивирования представлена в таблице 3. Экспериментально показано, что как для каллусогенеза так и для пролиферации на эксплантах семядольного узла эффективными оказались питательные среды, содержащие БАП 2,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л (43,6%), БАП 2,0 мг/л + ИУК 1,0 мг/л (20,4%); на фрагментах гипокотиля – кинетин 0,5 мг/л + НУК 2,5 мг/л (31,5%), БАП 2,0 мг/л + ИУК 1,0 мг/л (26,8%) (табл. 3, рис. 1).

Таблица 3

Пролиферация побегов на каллусе *Digitalis grandiflora* в зависимости от гормонального состава питательной среды

Регуляторы роста, мг/л				Сегменты			
				семядольного узла		гипокотиля	
Кинетин	НУК	БАП	ИУК	общее число	из них пролиферирующих, %	общее число	из них пролиферирующих, %
0,5	2,5	-	-	30	7,2 ± 0,6	30	31,5 ± 1,6
-	-	5,0	1,0	20	20,4 ± 0,9	20	26,8 ± 1,2
-	1,0	2,5	-	15	43,6 ± 1,0	15	10,2 ± 0,8

Для инициации морфогенетических процессов на листовых эксплантах фрагменты листьев микропобегов были помещены на модифицированные среды MS, содержащие глицин 2,0 мг/л, гидролизат казеина и мезоинозит по 100,0 мг/л. Для выявления роли регуляторов роста в инициации каллусогенеза на листовых эксплантах использовали ауксины: 2,4-Д, НУК, ИУК и цитокинины: кинетин, БАП в различных комбинациях и концентрациях. Всего испытано 4 варианта питательной среды MS: вариант I – 2,4-Д 2,0 мг/л + кинетин 0,2 мг/л; вариант II – БАП 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л; вариант III – БАП 0,2 мг/л + НУК 0,03 мг/л; вариант IV – БАП 1,0 мг/л + ИУК 1,0 мг/л. Экспланты культивировали при температуре 20°C в темноте. В ходе исследований выявили, что на БАП 1,0 мг/л + ИУК 1,0 мг/л образование каллусной ткани не отмечалось и морфогенез отсутствовал. Сегменты листьев также оказались неспособными к пролиферации *in vitro* на БАП 0,2 мг/л + НУК 0,03 мг/л. Экспланты постепенно в течение 30-50 суток некротизировали. В то же время на 2,4-Д 2,0 мг/л + кинетин 0,2 мг/л и БАП 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л наблюдалось образование плотного морфогенного каллуса. Следует отметить, что каллусы, культивируемые, в условиях темноты в последующем имели высокий морфогенный потенциал (65,2%) и формировали микропочки с образованием конгломерата коротких побегов (длиной 1-3 см). В целом из 10-15 микропочек удалось получить 2-3 микропобега на одном экспланте, способных к дальнейшему росту. Коэффициент размножения составил 1:3.

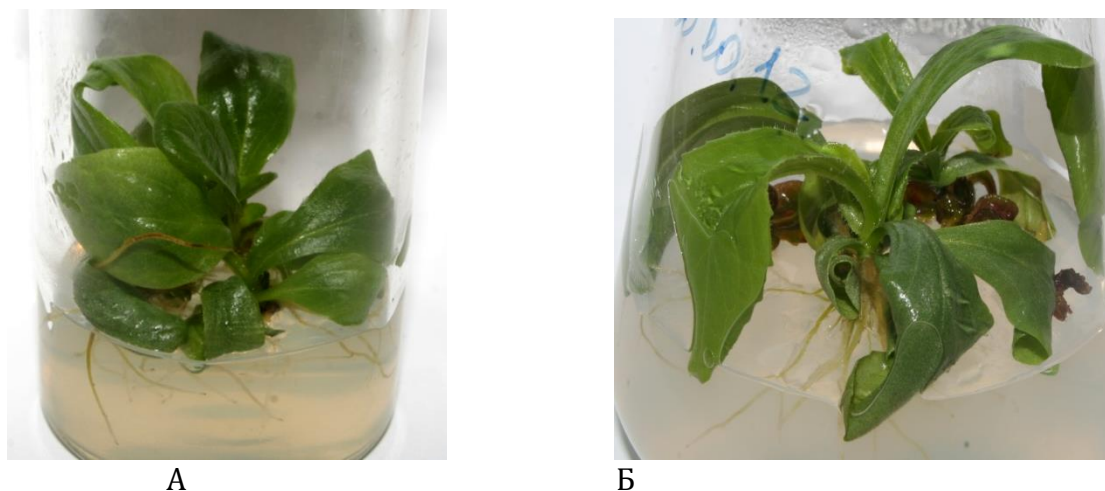


Рис. 1. Пролиферация побегов *Digitalis grandiflora*: А – на эксплантах семядольного узла на питательной среде MS, содержащей БАП 2,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л; Б – на фрагментах гипокотыля на питательной среде MS, содержащей кинетин 0,5 мг/л + НУК 2,5 мг/л

Таким образом, показано, что клетки специализированных тканей *D. grandiflora* в культуре *in vitro* способны к каллусогенезу и морфогенезу. Экспланты семядольного узла, гипокотыля и фрагментов листьев формируют морфогенную каллусную ткань с последующим развитием побегов.

Разработаны эффективные условия получения стерильной культуры наперстянки крупноцветковой. Подобраны оптимальные питательные среды для культивирования эксплантов, базовой основой которой является среда по прописи Мурасиге и Скуга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М., 1964. – 272 с.
2. Кучеров Е.В., Щелокова Л.Г. Наперстянка крупноцветковая на Урале и ее рациональное использование. – Уфа, 1987. – 123 с.
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – № 13. – P. 473–497.

УДК 635.92:581.143.6

**РАЗМНОЖЕНИЕ *THERMOPSIS SCHISCHKINII* CZEFR.
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Зарипова А.А., Ахметова А.Ш., Мухаметвафина А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад-институт Уфимского научного центра Российской академии наук, г.Уфа, Россия

На территории Республики Башкортостан встречается термопсис Шишкина *Th. schischkinii* Czefr., который можно считать одним из подвидов используемого в научной медицине вида *Th. lanceolata*. Термопсис Шишкина встречается редко, внесен в Красную книгу Республики Башкортостан [1] с категорией 3 – редкий вид, его заготовки в природных местообитаниях полностью запрещены. В комплексе мероприятий, направленных на сохранение редких и исчезающих видов, должное место находит привлечение биотехнологических методов, что дает возможность эффективного и быстрого размножения.

Изучение морфогенетических процессов, протекающих в изолированной ткани растений в культуре *in vitro*, является необходимой основой для разработки технологий размножения *Th. schischkinii* в целях дальнейшей реинтродукции в естественные местообитания и тем самым сохранения и восстановления их природных популяций. Цель исследования состояла в изучении возможности применения культуры *in vitro* для размножения редкого лекарственного вида флоры Башкортостана *Th. schischkinii*.

Материалом для исследования послужили растения *Th. schischkinii*, произрастающие в Абзелиловском и Баймакском районах Республики Башкортостан, обладающие более высоким уровнем жизнеспособности растений, максимумом морфометрических параметров, семенной продуктивности, и высоким содержанием алкалоидов. В качестве первичных эксплантов использовали семена выше перечисленных популяций, которые были любезно предоставлены лабораторией дикорастущей флоры и интродукции травянистых растений (заведующая лабораторией – д.б.н. Л.М. Абрамова). Вторичными эксплантами являлись стерильные части проростков *Th. schischkinii*.

Приготовление и стерилизацию питательных сред для культивирования тканей и органов *Th. schischkinii* проводили согласно рекомендациям [2, 3]. В работе использовали питательные среды, приготовленные по прописи Мурасиге и Скуга [4]. Содержание агара в питательной среде составляло 0,6%.

Для индукции каллуса в культуре *in vitro* использовали части проростков. С помощью скальпеля из полученных стерильных проростков асептически отделяли корешок, гипокотиль, семядоли и стебелек. Изолированные части проростков специальной препаровальной иглой немедленно помещали на поверхность агаризованной среды в пробирках, чтобы избежать подсыхания.

Экспланты с индуцированными каллусами переносили на свежую питательную среду каждые 10–21 день в зависимости от скорости роста каллуса. Скорость каллусообразования определяли как время, необходимое для того, чтобы первые 50% эксплантов образовали каллус.

Известно, что для большинства видов семейства *Fabaceae* характерным является высокий процент твердых семян, низкая их всхожесть и растянутый период прорастания [5]. Для ускорения всхожести семян применяли скарификацию, благодаря которой было достигнуто повышение всхожести до 38% против 6% при посеве в почву не скарифицированными семенами растений обеих популяций.

Начиная работу с растительным объектом в культуре *in vitro*, необходимо предварительно найти удовлетворительные условия для его стерилизации. С целью получения эксплантов для каллусной культуры использовали проростки. Семена для проращивания помещали на питательную среду. На этапе изолирования эксплантов необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Это осуществляется путем стерилизации растительных тканей стерилизующими растворами [6]. Семена стерилизовали растворами веществ, содержащими ртуть (диацид), перекись водорода, спирт. Следовало подобрать такие концентрации стерилизующих агентов и экспозиции, которые не повреждали бы сами семена, не угнетали их всхожесть и обеспечивали максимальную стерильность.

Для оценки успешности стерилизации семян нами использованы следующие показатели: число инфицированных, некротизированных и жизнеспособных эксплантов после стерилизации. Результаты анализов показали, что, максимальная стерильность эксплантов при введении в культуру *in vitro* – 97% была достигнута при стерилизации 3%-ным раствором перекиси водорода в течение 5 мин, 70%-ным раствором этанола в течение 1 мин и 0,2%-ным раствором диацида в течение 20 мин.

Прорастание скарифицированных семян *Th. lanceolata* на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга, не содержащей гормонов, наблюдалось на четвертые сутки и достигала 97%. Очевидно, что механическое повреждение оболочки семян, питательная среда с минеральными солями и витаминами, а также благоприятные физические условия: температура 26°C и 16-часовой фотопериод снимают физиологический покой семян и существенно повышают их всхожесть, что может иметь значение при решении практических задач растениеводства.

Из полученных стерильных двухнедельных проростков асептически изолировали корешок, гипокотиль, семядоли, стебелек и высаживали их на среду Мурасиге и Скуга, содержащую в своем составе кинетин, ИУК, НУК, БАП, и 2,4-Д.

Выявлено, что каллусообразующая способность фрагментов проростка *Th. schischkinii* различна, интенсивность ее зависела от типа экспланта и гормональных факторов среды. Аналогичная зависимость показана и на других видах растений [7, 8, 9, 10, 11].

Каллусогенез гипокотилия был значительно выше, чем у других фрагментов проростка. Объем каллуса на гипокотиле превосходил таковой на других частях проростка. Интенсивность образования каллуса на гипокотиле на 21-й день увеличивалась вдвое. Подобрана питательная среда с комбинацией гормональных веществ: НУК 2,0 мг/л и БАП 0,2 мг/л, на которой все экспланты, используемые в эксперименте, образовывали каллус в той или иной степени.

Присутствие в питательной среде 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л с кинетином в концентрации 0,5 мг/л вызывало некроз тканей. Это явление наблюдалось на корешках уже на седьмой день культивирования, у остальных частей проростка – на 21-й день культивирования.

В результате наблюдений выявлено разное местообразование каллусных тканей на эксплантах. На семядолях каллус образовывался по краю листовой пластинки и в основании черешка, на корешках – в небольших количествах по всей поверхности, бо-

лее интенсивное каллусообразование наблюдалось на стебле и самый мощный каллусогенез – на гипокотиле *Th. schischkinii*.

Каллусная ткань представляла собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенной анатомической структуры. Каллус был белого слегка желтоватого цвета, средней плотности.

Для дифференциации побегов на каллусе использовали среду по прописи Мурасиге и Скуга, дополненную следующими регуляторами роста: БАП в концентрации 2,0 мг/л, кинетин – 1,0 мг/л, ИУК– 0,8 мг/л. Коэффициент размножения побегов через 6 недель культивирования эксплантов при оптимальном сочетании гормонов в среде составил 8,2.

У *Th. schischkinii* выявлено два типа морфогенеза: каллусообразование с последующей регенерацией адвентивных побегов и пазушное побегообразование.

При культивировании на этой же питательной среде прегенеративных особей *Th. schischkinii* в возрастных состояниях проростков, ювенильных и имматурных растений, выращенных из асептических семян, получали различный коэффициент мультипликации. Данные представлены в таблице 3.

Коэффициент мультипликации, определяемый через месяц культивирования, у ювенильных растений превосходил этот показатель у проростков и имматурных растений. Таким образом, для массового размножения *Th. schischkinii* можно рекомендовать использование растений в ювенильном возрастном состоянии.

Укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным являются наиболее трудоемкими этапами от которых зависит успех клонального микроразмножения.

Результаты экспериментов показали, что наиболее легко укоренялись побеги, длина которых превышала 12 мм. На этапе же размножения основную массу составляют укороченные побеги. Для их удлинения применяли пересадки на пониженные концентрации БАП (0,1 мг/л). Снижение содержания БАП в питательной среде до 0,1 мг/л обеспечивало рост побега. Элонгацию побегов отмечали через 4 недели. В результате полного исключения цитокинина в следующем пассаже наблюдали начальные этапы ризогенеза, но дальнейшего развития не происходило (рис. 4). Поэтому на этапе укоренения изменяли основной состав среды: концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасиге и Скуга уменьшали вдвое, уменьшили количество сахара до 10 мг/л и полностью исключили цитокинины, оставив лишь один ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования использовали β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Укоренение микропобегов проводили способом непосредственного культивирования микропобегов в течение 3 недель на питательной среде, содержащей ИМК в концентрации 1 мг/л.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений – весна или начало лета [12]. Растения с хорошо развитой корневой системой осторожно вынимали из колб или пробирок пинцетом с длинными концами. Корни отмывали от остатков агара проточной водой. Почвенный субстрат предварительно стерилизовали при 85-90°C в течение 1 ч.

Растения-регенеранты пересаживали в стаканчики с почвенным субстратом из дерновой почвы, песка и торфа в соотношении 1: 1: 1, которые содержали в теплице с высокой влажностью воздуха.

В первые 2-3 недели растения накрывали полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывали до полной адаптации растений. Приживаемость регенерантов составляла 87%.

Адаптированные растения, полученные в культуре *in vitro* через 2–3 месяца выращивания в почвенных субстратах, переводили в открытый грунт.

Таким образом, использование нескольких стерилизующих веществ, в различных концентрациях и комбинациях позволило найти оптимальные условия стерилизации эксплантов. В результате отработки методов стерилизации показано, что максимальное число жизнеспособных эксплантов (97%) образовывалось при использовании комбинации стерилизующих растворов: 3 % перекиси водорода в течение 5 мин, 70% этанола – 1 мин, 0,1 % диацида – 20 мин.

Реализация морфогенетических потенциалов *Th. schischkinii* в культуре *in vitro* в определенной степени зависела от типа экспланта и гормонального состава питательной среды. Для регенерации растений из каллуса необходимы среды с более высоким содержанием цитокининов.

Доказано преимущество питательной среды, содержащей 2,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л кинетина, 0,8 мг/л ИУК для мультипликации побегов.

Для *Th. schischkinii* в условиях *in vitro* характерны два процесса морфогенеза: каллусогенез с последующим образованием побегов с коэффициентом размножения равным 8,2 и пазушное побегообразование с максимальным коэффициентом мультипликации – 20 у растений ювенильного возрастного состояния.

Определены условия укоренения и перевода растений-регенерантов, выращенных *in vitro*, в почвенный субстрат, обеспечивавшие высокую (87%) приживаемость растений.

Разработанный нами метод микроразмножения *Th. schischkinii in vitro* позволяет успешно решить проблему сохранения этого редкого и исчезающего вида растения, сократить сроки получения массового посадочного материала.

Работа выполнена в рамках Программы Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий».

Список литературы

1. *Абрамова Л.М.* Термопсис Шишкина // Красная книга Республики Башкортостан. Т.1: Растения и грибы. – Уфа: МедиаПринт, 2011. – С. 167.
2. *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М., 1964. – 272 с.
3. *Калинин В. Ф., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / *Murashige T., Skoog F.* // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – N 13. – P. 473 – 497.
5. *Ахметова А.Ш.* Размножение *Hedysarum argyrophyllum* Ledeb. *in vitro* / А.Ш. Ахметова // *Агрехимия.* – 2013 – № 9. – С. 55 – 58.
6. *Зарипова А.А.* Микрклональное размножение *Paeonia anomala* L. (*Paeoniaceae*) *in vitro* / *Зарипова А.А., Байбурина Р.К.* // *Раст. ресурсы.* – 2005. – Т. 41. – В. 4. – С 22 – 30.
7. *Ишмуратова М.М.* Особенности морфогенеза *Polemonium caeruleum* L. *in vitro* и *in vivo* / *Ишмуратова М.М., Зарипова А.А.* // *Раст. ресурсы.* – 2000. – Т. 36 – В. 3. С. 106 – 114.
8. *Зарипова А.А.* Начальные этапы клонального микроразмножения пиона уклоняющегося боковыми почками / *Зарипова А.А.* // *Вест. Оренбург. гос. ун-та.* – 2009. – № 6. – С. 140 – 142.

9. Зарипова А.А. Размножение в культуре *in vitro* *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin / Зарипова А.А., Ахметова А.Ш. // Вест. Оренбург. гос. ун-та. – 2009. – № 6. – С. 143 – 144.
10. Ахметова А.Ш. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность тканей и органов тюльпана в культуре *in vitro* / Ахметова А.Ш., Байбурина Р.К., Миронова Л.Н. // Агрехимия. – 2010. – № 7. – С. 33– 40.
11. Мухаметвафина А.А. Размножение *Stemmacantha serratuloides* (Georgi) M. Dittrich в культуре *in vitro* / Мухаметвафина А.А., Ахметова А.Ш. // Биотехнология. – 2011. – № 5. – С. 73– 79.
- Зарипова А.А. Опыт размножения *Oenothera biennis* L. в культуре *in vitro* / Зарипова А.А., Ахметова А.Ш., Мухаметвафина А.А., Миронова Л.Н. // Вест. Воронеж. гос. ун-та. – 2011. – № 2. – С. 107 – 109.
- УДК636.4.084.4

УДК 635.92:581.143.6

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *POLEMONIUN CAERULEUM* L.

Зарипова А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический сад-институт Уфимского научного центра
Российской академии наук, г.Уфа, Россия

Объектом наших исследований являлся фармакопейный вид растения *Polemonium caeruleum* L. – многолетнее травянистое растение семейства *Polemoniaceae*. В Башкортостане обитает почти во всех районах, но встречается небольшими куртинками [1]. Вид обладает медленной регенерационной способностью. Заготовка корней не может проводиться в значительных количествах. Это связано с длительным возобновлением особей. Повторная заготовка на одной территории возможна только через 5-7 лет [2]. *P. caeruleum* применяется в фармакологии как отхаркивающее средство при заболеваниях легких и дыхательных путей. Корневища и корни обладают седативным действием. Эта активность превышает аналогичный эффект валерианы лекарственной в 8-10 раз [3]. Разработка технологии размножения *in vitro* *P. caeruleum* является актуальной для решения проблемы сохранения этого редкого ресурсного вида и расширения сырьевой базы.

Целью работы являлась разработка клонального микроразмножения *P. caeruleum* и изучения морфогенеза в культуре *in vitro*.

В качестве исходного материала для введения в культуру *in vitro* использовали почки возобновления, почки репродуктивного побега и семена. Стерилизацию сред, исходного материала и работу в асептических условиях проводили согласно имеющим-

ся рекомендациям [4, 5]. В работе использовали среду, приготовленную по прописи Т. Murashige и F. Skoog (MS) [6].

Для инициации морфогенетических процессов в качестве регуляторов роста использовали: 6-бензиламинопурин (БАП), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), индолилмасляную кислоту (ИМК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), нафтилуксусную кислоту (НУК), кинетин.

Стерилизация растительного материала. Поверхностную стерилизацию эксплантов проводили согласно общепринятым методикам с использованием в качестве стерилизующих агентов ртуть- и серебросодержащие соединения. Семена и почки вначале стерилизовали в 70 % растворе этанола, затем в одном из следующих дезинфицирующих растворов: 3 % растворе перекиси водорода, 0,1 % растворе диацета или 0,2 % растворе нитрата серебра. Используемые нами стерилизующие растворы по-разному влияли на жизнеспособность эксплантов. Стерилизация семян *P. caeruleum* в 3 % растворе перекиси водорода снижала их жизнеспособность по сравнению с 0,1 % раствором диацета и 0,2 % раствором нитрата серебра (таб. 1).

Максимального числа жизнеспособных (86.6 %) и минимального числа инфицированных (2.8 %) семян удалось достичь при последовательном выдерживании их в 70 % растворе этанола в течение 1 мин и 0,1 % растворе диацета в течение 7 мин (табл. 1). Наибольшая инфицированность и низкая жизнеспособность выявлена у семян, обработанных с использованием перекиси водорода и нитрата серебра.

Таблица 1

Влияние стерилизующих растворов на жизнеспособность семян *Polemonium caeruleum* L. в культуре *in vitro*

Стерилизующий раствор, экспозиция	Число инфицированных, %	Число жизнеспособных, %	Число некротизированных, %
70% этанол – 1 мин 3% H ₂ O ₂ – 15 мин	69.5	9.1	21.4
70% этанол – 1 мин 0,1% диацет – 7 мин	2.8	86.6	10.6
70% этанол – 1 мин 0,1% диацет – 10 мин	2.0	58.7	39.3
70% этанол – 1 мин 0,2% AgNO ₃ – 8 мин	36.1	40.3	23.6

Стерилизация почек возобновления *P. caeruleum* в 3 % растворе перекиси водорода и 0,2 % растворе нитрата серебра снижала их жизнеспособность по сравнению с 0,1 % раствором диацета (таб. 2).

Особые синюхи вегетируют до ноября месяца. Для введения в культуру *in vitro* почки возобновления, изолированные в этот период даже при достаточно длительной обработке диацетом (45 мин) дали недостаточно высокого процента стерильного материала.

Максимального числа жизнеспособных (45.4 %) и минимального числа инфицированных (21.9 %) почек возобновления удалось достичь при последовательном выдерживании их в 70 % растворе этанола в течение 1 мин и 0,1 % растворе диацета в течение 45 мин (табл. 2).

Таблица 2

Влияние стерилизующих растворов на жизнеспособность почек возобновления *Polemonium caeruleum* L. в культуре *in vitro*

Стерилизующий раствор, экспозиция	Число инфицированных, %	Число жизнеспособных, %	Число некротизированных, %
70% этанол – 1 мин 3% H ₂ O ₂ – 10 мин	18.3	0.5	81.2
70% этанол – 1 мин 0.1% диацид – 30 мин	99.0	0.8	0.2
70% этанол – 1 мин 0.1% диацид – 35 мин	78.6	17.6	3.8
70% этанол – 1 мин 0.1% диацид – 45 мин	21.9	45.4	32.7
70% этанол – 1 мин 0.2% AgNO ₃ – 10 мин	22.3	0.3	77.4

Асептическую обработку почек репродуктивного побега проводили по схеме варианта стерилизации, который оказался наилучшим для дезинфекции почек возобновления: в 70 % растворе этанола в течение 1 мин и 0.1 % растворе диацида в течение 45 мин. Использованная схема позволила получить 76.8 % жизнеспособного неинфицированного материала.

Определение морфофизиологической активности эксплантов в культуре in vitro. Для инициации морфогенетических процессов *P. caeruleum* в качестве эксплантов использовали семядоли проростков. При изучении способности семядолей к каллусогенезу нами испытаны 16 вариантов питательной среды MS, содержащих различные комбинации и концентрации гормональных факторов, таких как БАП, 2,4-Д, кинетин, НУК. Пластинки семядолей на средах, содержащих кинетин + 2,4-Д и кинетин + НУК каллусообразования не наблюдали или же оно было незначительным. Сильный каллусогенез вызывали высокие концентрации 2,4-Д в комбинации БАП + 2,4-Д или низкие концентрации БАП и НУК. Культивирование черешков семядолей на средах, содержащих комбинации БАП + 2,4-Д и БАП + НУК, приводило к значительному каллусообразованию. Отсутствие каллусов на черешках семядолей наблюдали в вариантах кинетин + НУК. Комбинации кинетин + 2,4-Д вызывали незначительный каллусогенез.

Во всех вариантах опыта каллус формировался по месту среза экспланта, по консистенции рыхлый, белого цвета, мелкозернистый. При последующем субкультивировании цвет каллуса менялся до светло-зеленого. Образование аналогичного каллуса наблюдали на средах ИУК 0,5 мг/л + кинетин 0,5 мг/л, БАП 0,5 мг/л + ИУК 0,1 мг/л и ИМК 0,5 мг/л. Плотный, твердый, бело-зеленый каллус формировался на среде, содержащей БАП 1,0 мг/л + кинетин 1,0 мг/л.

Изучение регенерационной способности P. caeruleum в культуре in vitro. Для регенерации растений каллусы переносили в условия фотопериода с исключением 2,4-Д из питательной среды. Через 2 недели культивирования каллусы приобретали зеленую окраску, ещё через неделю наблюдали формирование растений-регенерантов. Растения-регенеранты по мере роста отделяли и пересаживали на стандартную питательную среду MS для элонгации.

Мультипликацию побегов *P. coeruleum*, т.е. их многократное увеличение проводили на растениях, выращенных из почек возобновления и семян в условиях *in vitro* и достигших виргинильного возрастного состояния. Для размножения побегов в питательную среду добавляли физиологически активные вещества БАП, кинетин и ИУК, оптимальная концентрация которых была установлена экспериментально. Использовали шесть вариантов питательной среды MS (табл. 5).

Таблица 5

Влияние регуляторов роста на побегообразование *Polemonium caeruleum* L.

Регуляторы роста, концентрация	Коэффициент размножения	Длина побега, мм
БАП 0,5 мг/л + ИУК 1,0 мг/л	6.7 ± 0.25	34.58 ± 1.39
кинетин 0,5 мг/л + ИУК 1,0 мг/л	1.1 ± 0.21	127.56 ± 3.97
БАП 0,5 мг/л + кинетин 0,5 мг/л	31.2 ± 0.19	17.08 ± 1.32
БАП 1,0 мг/л + кинетин 1,0 мг/л	34.5 ± 0.23	11.81 ± 2.34
БАП 0,5 мг/л + кинетин 0,5 мг/л + ИУК 1,0 мг/л	28.9 ± 0.17	32.08 ± 1.50
БАП 1,0 мг/л + кинетин 1,0 мг/л + ИУК 1,0 мг/л	60.3 ± 0.31	29.39 ± 1.54

Серия экспериментов с регуляторами роста цитокининовой и ауксиновой природы позволила выделить комбинацию гормонов БАП, кинетин и ИУК, которая обеспечивала высокую частоту побегообразования. На питательной среде MS, дополненной БАП в концентрации 1.0 мг/л, кинетин - 1.0 мг/л и ИУК - 1.0 мг/л происходил активный рост побегов из пазух листьев. В течение месяца развивалось 12 дополнительных побегов, которые в свою очередь тоже ветвились, образуя конгломерат, состоящий в среднем из 60.3 побегов. Коэффициент размножения достигал до 120. Размноженные побеги пересаживали на питательную среду для элонгации и в дальнейшем для укоренения.

Укоренение размноженных побегов и перевод растений-регенерантов в почвенные условия культивирования. Для стимуляции процесса формирования корней из питательной среды исключали цитокинины. Побеги укореняли на среде MS, дополненной ауксинами в 3 вариантах: 1) ИМК 0,5 мг/л; 2) ИМК + ИУК по 0,25 мг/л; 3) ИУК 0.5 мг/л (табл. 6). Начало корнеобразования наблюдали на 14 день культивирования.

Результаты по укоренению размноженных побегов, представленные в таблице 6, свидетельствуют о том, что наиболее эффективной являлись среды с добавлением ИУК 0,5 мг/л и ИМК + ИУК по 0,25 мг/л, обеспечивающие высокую укореняемость (99.3 % и 98.1 % соответственно) и наибольшее число образовавшихся корней (7.9 шт. и 8.7 шт. соответственно).

Растения-регенеранты с хорошо сформированной корневой системой и 5-7 листьями, высаживали в стаканчики с почвенным субстратом, состоящим из дерновой почвы и вермикулита в соотношении 3:1. Растения помещали в климатическую камеру с вы-

сокой относительной влажностью воздуха (85–90%) для их акклиматизации. Приживаемость их составила 89 %.

Таблица 6
Влияние регуляторов роста на укоренение побегов *Polemonium caeruleum* L.
в культуре *in vitro*

Регуляторы роста, мг/л	Укореняемость, %	Число корней, шт.	Длина корней, мм
ИМК 0,5	89.3 ± 7.6	4.2 ± 0.9	12.2 ± 4.2
ИМК 0,25 ИУК 0,25	98.1 ± 6.4	8.7 ± 0.3	24.6 ± 2.8
ИУК 0,5	99.3 ± 5.3	7.9 ± 0.5	20.7 ± 1.2

Адаптированные к почвенным условиям растения-регенеранты были высажены на экспериментальный участок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кучеров Е.В. Ресурсы и интродукция полезных растений в Башкирии. М., 1987. 204 с.
 2. Кучеров Е.В., Лазарева Д.Н., Десяткин В.К. Лекарственные растения Башкирии: их использование и охрана. Уфа: Башк. Кн. Изд-во, 1990. 272 с.
 3. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск, 1991. С. 146-148.
 4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964.
 5. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. М., 1983.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, N 13. P. 473-497.

УДК 602

ВЛИЯНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГМ-СОИ В РАЦИОНАХ НА БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС КРОВИ И ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА СВИНЕЙ

Зиновьев С.Г., Биндюг А.А.

Лаборатория кормления Института свиноводства и АПП НААН Украины,
г. Полтава, Украина

В наше время генная инженерия нашла наиболее широкое применение в сфере производства новых сортов сельскохозяйственных растений, которые владеют признаками, отсутствующими у аналогичных традиционных форм (агрогенная инженерия), так как генно-инженерные манипуляции с растениями проводить существенным образом проще, чем с животными [5].

Эта технология не приводит к быстрым, ярко выраженным отрицательным последствиям для здоровья человека и природы, главная потенциальная ее опасность – в возможности проявления отдаленных следствий. В экспериментальных исследованиях на животных обнаружено отрицательное влияние на морфофункциональное состояние органов и систем организма животных, репродуктивную функцию, иммунный статус, биохимические показатели крови и мочи [2, 6, 7, 17, 18].

Указанные данные дают основание считать, что окончательного ответа о безопасности пищевых ГМ растений для организма животных и человека мировым научным сообществом еще не получено [3, 7, 15, 16]. Поэтому работы по изучению следствий применения ГМ пищевых (кормовых) продуктов на здоровье человека и животных, имеют актуальность для безопасности жизнедеятельности общества и экологии.

Цель исследований и методика их проведения. Целью наших исследований было провести сравнительный анализ влияния комбикормов, в состав которых входили генетически модифицированная и обычная соя, на некоторые биохимические показатели крови свиней.

Исследование по выявлению наличия генетически модифицированных конструкций было проведено в лаборатории генетики Института свиноводства и агропромышленного производства НААН Украины. Качественный и количественный анализ сои на содержание генетически модифицированных ингредиентов проводился с использованием коммерческих ПЦР-тест наборов, согласно действующим нормативным документам на методы исследований: ГСТУ ISO 21569.2008, ГСТУ ISO 21570:2008, ГСТУ ISO 21571.2008. Для определения наличия ГМ-события проводили выделение ДНК из объектов растительного происхождения (соя) с использованием коммерческого набора «сорб-ГМО-Б» «Синтол» Россия согласно инструкции производителя.

Опыты на ремонтном молодняке свиней проведены согласно методике научно-хозяйственных опытов [9] в условиях станции контрольного откорма Института свиноводства и АПП НААН. С этой целью было сформировано две подопытных группы из свиней-аналогов по возрасту, происхождением и живой массой, по 12 голов в каждой (8 свинок 4 хрячка). В состав рационов кормления свиней входило 10 % (по массе) полнжировойэкструдованной сои сорта «Ворскла» (контрольная группа, без ГМО) и такое же количествоэкструдованнойГМ-сои (опытная группа, RR, линия 40.3.2).

Кровь у животных отбирали из ушной краевой вены, натошак по достижению животными 4-х и 8 месячного возраста. Биохимические показатели, которые характеризуют обмен веществ у животных, определяли с использованием коммерческих наборов фирмы «Филисит Диагностика» Украина: общий белок – по биуретовой реакции (г/л), активность АлАТиАсАТ определяли динитрофенилгидразиновы методом по Райтману-Френкелю (мкмоль/(час×мл)), глюкозу - глюкозооксидазным методом (ммоль/л), общие липиды - по реакции с фосфорнованилиновым реактивом (г/л), общий холестерин – ферментативным методом (ммоль/л), общий кальций (Ca) - с использованием в-крезолфталеинового комплекса (ммоль/л), фосфор (P) - с молибденовой кислотой(ммоль/л) [10, 11, 12, 13].

При достижении физиологической зрелости, хрячков возрастом 6-7 месяцев приучали к садке на чучело. Оценку качества спермы проводили согласно действующей инструкции по искусственному осеменению свиней [4]. После становления половых циклов у подопытных свинок, и при достижении ими живой массы 110 - 120 кг их искусственно осеменяли разбавленной спермой хряков-производителей, аналогов по рациону кормления. На протяжении периода искусственного осеменения свинок регистрировали количество спермы израсходованной на одно результативное оплодотво-

рение и наличие перегулов. Воспроизводительные качества свинок определяли по показателям их многоплодия, среднесуточных приростов поросят за подсосный период и их сохранности к отъёму.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 8.0, предварительно проверив нормальность их распределения по *W* тесту Шапиро-Вилка и тестом Лилиефорса. Рассчитывались такие показатели описательной статистики: среднее и его ошибка, 95% доверительный интервал (95 % ДИ), стандартное отклонение (*S*) и коэффициент вариации (*Cv*) по выборке. Достоверность разницы рассчитывали с использованием *t*-теста для зависимых и независимых выборок [1,8, 14].

Результаты исследований. В результате анализа полученных данных установлены как возрастные изменения биохимических показателей крови растущего молодняка свиней, так и связанные с использованием ГМ сои в рационах.

Так, количество общего белка в крови в возрасте 4-х месяцев в обеих группах было практически одинаковым, а в 8 месяцев его количество увеличилось до $99,11 \pm 11,235$ г/л в контрольной группе и до $89,29 \pm 3,858$ г/л в опытной. Доверительный интервал для 8-ми месячных свиней при этом составлял 63,35 – 134,86 г/л для контрольной крупы и 77,01 – 101,56 г/л, а коэффициент вариации 22,672% и 8,641% соответственно. Как видим вариативность этого показателя в контрольной группе была значительно выше.

Что касается аспартат- и аланинаминотрансфераз то выявлено значительное достоверное увеличение их активности в крови свиней опытной группы. Так, если с 4-х и до 8 месячного возраста активность АсАТ в крови свиней контрольной группы увеличилась на 12,73 % то в опытной группе на 56,90 % ($p=0,004$) соответственно. Активность АлАТ при этом возросла на 24,14 % ($p=0,04$) и 72,41 % ($p=0,0006$). При этом активность этих трансаминаз в 8-ми месячном возрасте достоверно выше в крови свиней получавших ГМ-сою на 46,77 % ($p=0,000025$) и 38,89 % ($p=0,000017$). Коэффициент де Ритиса при этом находился в пределах физиологической нормы для свиней. Это может говорить о некотором отрицательном влиянии ГМ сои на состояние, как их печени, так и миокарда.

Наблюдается достоверное связанное с возрастом увеличение количества глюкозы в крови обеих опытных групп, в контрольной на 69,03 % ($p=0,0006$) и на 74,67 % в опытной ($p=0,0099$). В возрасте 8 месяцев доверительный интервал для этого показателя составлял 7,79 – 9,34 ммоль/л и 7,62 – 11,13 ммоль/л, а коэффициент вариации 5,672 % и 11,765 %. Подобно глюкозе с 4-х до 8 месяцев концентрация общих липидов в крови свиней обеих опытных групп также достоверно возрастала, на 3,50 ммоль/л ($p=0,02$) в контрольной и на 4,01 ммоль/л ($p=0,01$) в опытной. Выявлено также незначительное увеличение количества общего холестерина в крови контрольных животных, в то же время у свиней опытной группы увеличение количества холестерина в крови было более выраженным. Очевидно, достаточно значительное его увеличение нивелируется возрастанием вариабельности этого показателя с возрастом у подопытных свиней обеих групп.

Что касается кальция и фосфора, то в контрольной группе значимых изменений этих показателей не выявлено. Хотя в крови 8-ми месячных свиней опытной группы наблюдается достоверное увеличение количества неорганического фосфора, как по сравнению с 4-х месячными животными ($p=0,04$) так и по сравнению с контролем ($p=0,01$).

Качество спермопродукции у хряков обеих групп было в пределах физиологической нормы. Тем не менее, наблюдается достоверная разница по показателям объема эякулята и концентрации в нем спермы. Причем, при преимуществе хряков контрольной группы над опытными по объему на 32,4% (227,6 см³ против 171,9 см³) они достоверно уступали аналогам опытной группы по концентрации спермиев соответственно на 38,6 млн/см³ ($p \leq 0,046$).

Однако, общее количество спермиев в эякулятах существенно не отличалась: у контрольных и опытных хряков она представляла в среднем соответственно 39,6 и 37,1 млрд. Учитывая то, что активность спермиев находилась на одном уровне (7,9 балла), а вариабельность этого показателя была низкой (4,56 % и 6,35 %) количество спермиев с прямолинейно-поступательным движением в эякуляте существенно не отличалась у хрячков контрольной и опытной групп (31,2 млрд. против 29,3 млрд.).

По результатам искусственного осеменения свинок перегулов в контрольной группе было выявлено всего два (у одного животного), тогда когда в опытной – девять (у четырех животных), что сказалось на плотности полученных опоросов. Многоплодие свиноматок, что потребляли сою без ГМО было достоверно большим на 44,2 % (10,57 против 7,33 поросят, при $p=0,03$). Количество мертворожденных поросят составляло соответственно 10,78 % и 13,64 %. Лучший показатель многоплодия контрольных свинок существенно повлиял на общее количество новорожденных поросят: от животных этой опытной группы получено 74 поросёнка, или на 30 голов больше чем в опытной группе. Живая масса поросят при рождении была в пределах физиологической нормы и существенно не отличалась между свиноматками разных групп. Половое соотношение поросят в гнездах свиноматок, которым скармливали рацион с ГМ-соей отличалось от такого, которые имели аналоги контрольной группы: в опытной группе в гнездах при рождении было больше хрячков, а в контрольной – свинок.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что введение 10 % генетически модифицированной сои в рацион растущего молодняка свиней имеет существенное достоверное ($p=0,000025$ и $p=0,000017$) влияние на повышение активности аспартат- и аланинаминотрансфераз в крови свиней.

Выявлено достоверное увеличение количества неорганического фосфора, как по сравнению с 4-х месячными животными ($p=0,04$) так и по сравнению с контролем ($p=0,01$).

Остальные исследуемые показатели в контрольной и опытной группах свиней достоверно не отличались, и по ним выявлены только возрастные изменения.

Объем эякулята спермы хряков контрольной группы был большим – (227,6 см³ против 171,9 см³) – на 32,4%, но по показателю концентрации спермиев – наоборот меньшим на 21,17 % ($p \leq 0,046$). Увеличение концентрации активных спермиев в эякуляте контрольных хряков на 1,9 млрд. дало возможность получить дополнительное количество спермодоз.

Многоплодие свиноматок первоопоросок, которые потребляли сою без наличия в ней ГМО было большим на 44,2 % (10,57 голов поросят против 7,33, при $p=0,03$), среднесуточные приросты и соответственно их живая масса при отлучении были достоверно ($p=0,011$) большими в гнездах свиноматок контрольной группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. Ю.А. Данилова. М.: Практика, 1998. 459 с. 1

2. Гормональная регуляция половой функции гистологические особенности яичников в эксперименте при использовании в пищу ГМО-сои / Т.В. Горбач, И.Ю. Кузьмина, Г.И. Губина-Вакулик, Н.Г. Колоусова // Таврический медицинско-биологический вестник. – 2012, том 15, №2, ч. 2 (58). – С. 235-238
3. Закревский В.В. Генетически модифицированные организмы растительного происхождения: проблемы и перспективы их использования в питании населения России / В.В. Закревский // Вопросы здорового и диетического питания. – 2011. – №01. – С. 49-58
4. Інструкція із штучного осіменіння свиней – К.: Аграрна наука. – 2003. – 56 с.
5. Картахенский Протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии (принят 29 января 2000 в г. Монреаль (Канада) и вступил в силу 11 сентября 2003 г. Ратифицировали Протокол 129 стран). 5
6. Кузнецов В.В. Генетически модифицированные организмы и полученные из них продукты: реальные и потенциальные риски / В.В. Кузнецов, А.М. Куликов // Российский химический журнал, 2005, № 69 (4). – с. 70-83.
7. Кузнецов В.В. Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры и полученные из них продукты: пищевые, экологические и агротехнические риски / В.В. Кузнецов, А.М. Куликов, В.Д. Циденбаев // Известия аграрной науки, 2010, том 8, № 3. – с. 10-30
8. Макарова Н.В. Статистика в Excel. М.: Финансы и статистика, 2002. 368 с.
9. Методики исследований по свиноводству. – Харьков: ВАСХНИЛ, Южное отделение, 1977. – С.69-83.
10. Наборы реактивов для исследования белкового обмена. – ТУ У 24.4-24607793-018-2003. – Свидетельство про государственную регистрацию № 2218/2003
11. Наборы реактивов для определения концентраций аналитов в биологических жидкостях (углеводный и липидный обмен). – ТУ У 24.4-24607793-020-2003. – Свидетельство про государственную регистрацию № 2219/2003
12. Наборы реактивов для определения концентраций аналитов в биологических жидкостях (пигментный и водно-солевой обмен). – ТУ У 24.4-24607793-019-2003. – Свидетельство про государственную регистрацию № 2217/2003
13. Наборы реактивов для определения активностей ферментов крови. – ТУ У 24.4-24607793-017-2003. – Свидетельство про государственную регистрацию № 2216/2003
14. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2003. 312 с.
15. A comparison of the effects of three G M Corn varieties on mammalian health / G. S. de Vendomois, F. Roullier, D. Cellier [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2009. – № 5 (7). – P. 706–726.
16. Environmental risk assessment of genetically modified plants - concepts and controversies / Angelika Hilbeck, Matthias Meier, Jörg Römcke [et al.] // Environmental Sciences Europe 2011, 23:13
17. Jeffrey M. Smith. Genetic Roulette. The documented health risks of genetically engineered foods. / Jeffrey M. Smith // Fairfield: Yes Books. — 2007. — 319 p.
18. Magaca-Gymez J.A. Risk assessment of genetically modified crops for nutrition and health. / Magaca-Gymez J.A, Calderyn de la Barca A.M. // Nutrition Reviews. 2008. — v. 67. — № 1. — P. 1–16.

УДК 631.87:631.46:633.63

**ИЗУЧЕНИЕ ОПОСРЕДОВАННОГО ВЛИЯНИЯ АНТИФУНГАЛЬНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ
НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РИЗОСФЕРЫ *BETA VULGARIS*
В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ ФИТОПАТОГЕНОМ**

Ильясова Е.Ю., Рафикова З.И., Григориади А.С.

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

В настоящее время сельское хозяйство является одним из источников загрязнения почвенной среды в результате использования химических средств защиты растений от вредителей [1-3]. Альтернативой химическим препаратам служат биологические, которые способны регулировать развитие патогенных популяций микроорганизмов. Кроме того, биопрепараты могут оказывать положительное влияние на ростовые процессы растений, что связано с их способностью продуцировать фитогормоны в окружающую среду [4]. Микробиологические препараты способствуют сохранению агрономически ценной микробиоты, а также улучшают общую экологическую обстановку в зоне их применения [4-6]. При выборе конкретного препарата следует читать его качественный состав, особенности района выращивания сельхоз культур, а также особенности почвы, включая микробиологическую активность и содержание в ней фитопатогенов. Интродукция несвойственных для почвы микроорганизмов в составе препаратов может повлечь за собой изменения в микробоценозе в целом, тем самым улучшить условия произрастания культур.

Целью данной работы стало изучение опосредованного влияния биопрепаратов Альбит и Витаплан на изменение ризосферной микробиоты под посевами *Beta vulgaris* в условиях искусственного заражения фитопатогеном.

Полевые опыты проводились в СНО «Заря» (Октябрьский район г. Уфы, Республика Башкортостан) на мелких делянках площадью по 5м². Характеристика почвы опытного поля: чернозем выщелоченный, pH - 5.4, Нг - 5.6 мг-экв./100 г почвы, содержание гумуса 8.7%, фосфора и калия 23 и 29 мг на 100 г почвы соответственно. Посадка сахарной свеклы была проведена в начале вегетационного периода, после появления всходов (на 12-14 сутки) растения были искусственно заражены фитопатогенным микромицетом *Alternaria alternata*. В фазу 2-3 пар и 4-6 пар настоящих листьев растения сахарной свеклы были обработаны биопрепаратами. Пробы почвы отбирались после сбора урожая. Учет численности почвенных микроорганизмов различных эколого-физиологических проводили в лабораторных условиях путем посева на твердые и жидкие питательные среды [7].

Витаплан - препарат на основе бактерии *Pseudomonas fluorescens*, представляющий собой эффективное биологическое средство защиты растений от грибных и бактериальных заболеваний. Обладает ростостимулирующими свойствами, способствует развитию мощной корневой системы. Альбит - препарат в состав которого входит естественный биополимер поли-бета-гидроксимасляная кислота из почвенных бактерий *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas aureofaciens*. В естественных природных условиях данные бактерии обитают на корнях растений, стимулируют их рост, защищают от болезней и неблагоприятных условий внешней среды. Основное отличие данных препаратов заключается в том, что Витаплан содержит живых микроорганизмов, а Альбит –

микробные метаболиты, что делает действие препарата более стабильным, менее подверженным влиянию условий внешней среды.

Использование биопрепаратов оказало благоприятное влияние на показатели биомассы растений сахарной свеклы. При двукратной обработке растений Витапланом и Альбитом средняя масса корнеплода увеличилась в 2,23 и 1,57 раз, а средняя масса наземной части растений возросла в 2,4 и 2 раза соответственно. Однако в условиях заражения *Alternaria alternata* эффективность препарата Альбит оказалась выше, чем Витаплана.

При характеристике общей микробиологической активности почвы была выбрана группа гетеротрофных микроорганизмов как наиболее многочисленная. Обработка Витапланом растений, произрастающих в почвах зараженных фитопатогеном, привела к уменьшению численности гетеротрофов. После внесения Альбита данный показатель стал превышать соответствующие значения контрольного варианта опыта.

Для оценки качества земель сельскохозяйственного назначения важную роль играет количество доступного азота в почве. Косвенным показателем благополучия почвы можно считать низкую численности денитрификаторов, которые переводят азот в газообразную форму и способствуют его потере [8].

Численность денитрификаторов в почве, искусственно зараженной *A. alternata*, была на порядок выше, чем в контрольных образцах (рис.1). Обработка Витапланом привела к значительному снижению количества данной группы микроорганизмов в почве к концу вегетации. Использование Альбита не оказало существенного влияния на изменение численности денитрификаторов в условиях заражения фитопатогеном.

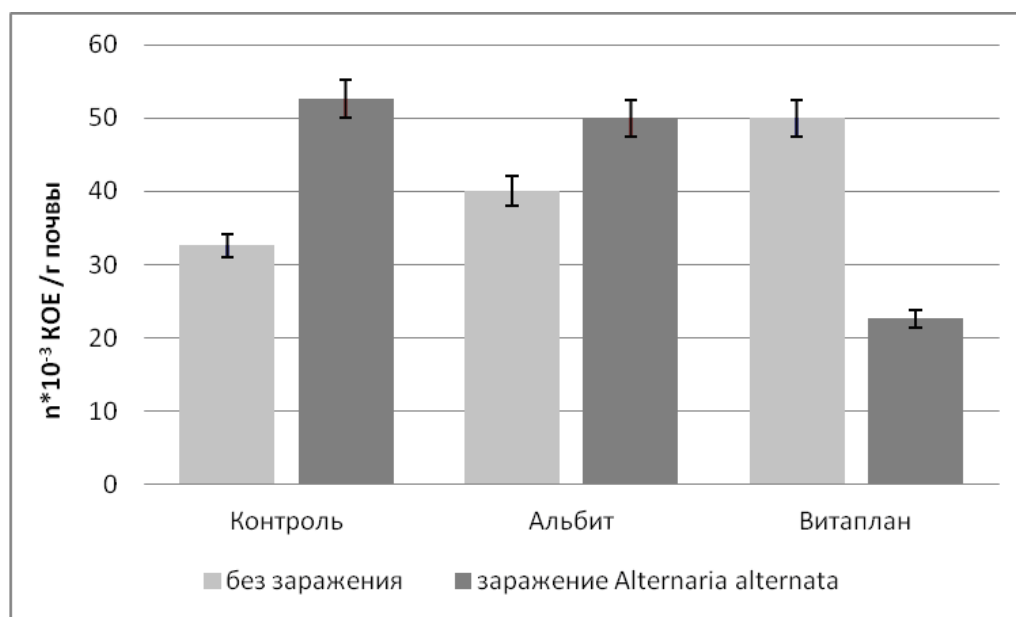


Рис. 1. Изменение численности денитрификаторов в ризосфере сахарной свеклы в условиях заражения *A. alternata*.

Другой важной составляющей частью почвенного микробиоценоза является комплекс целлюлозоразрушающих микроорганизмов, обеспечивающих разложение растительных остатков. Биопрепараты оказали неоднозначное влияние на численность целлюлозолитиков. Максимальное воздействие проявилось при использовании Витаплана, показатель численности микроорганизмов на 40% превышал контрольные цифры,

хотя и не достигал уровня, полученного при внесении препарата в незараженную почву.

Обработка Альбитом, напротив, оказало ингибирующее воздействие на целлюлозолитиков. В зараженных пробах количество микроорганизмов данной группы при использовании препарата снижало составило 35% по сравнению с показателем контроля (рис. 2).

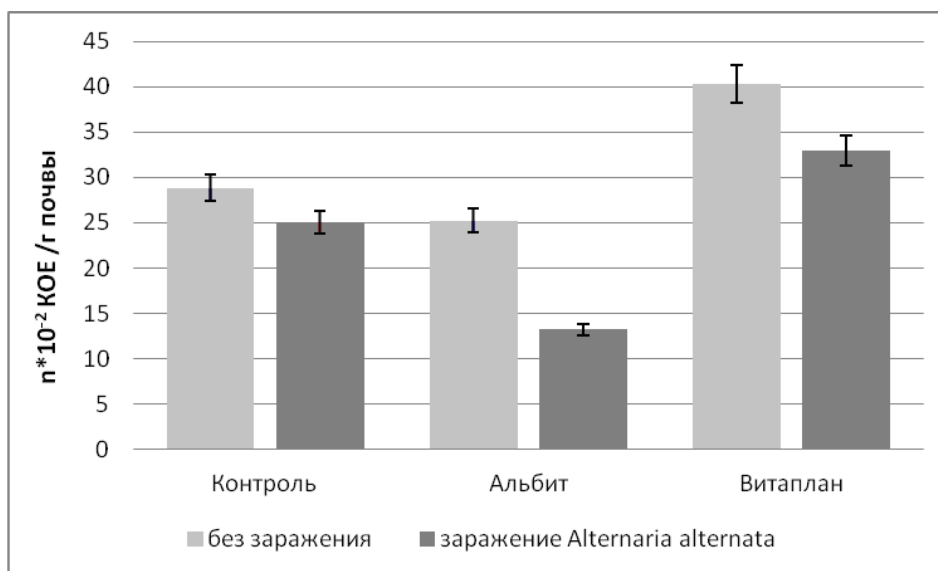


Рис. 2. Изменение численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов в ризосфере сахарной свеклы в условиях заражения *A. alternata*.

Фунгицидная активность биопрепаратов Альбит и Витаплан сохраняется даже при дополнительном заражении фитопатогеном. Так, во всех вариантах опыта с использованием препаратов численность микромицетов оставалась крайне низкой. Фунгицидную активность биопрепаратов подтверждают другие авторы [10, 11].

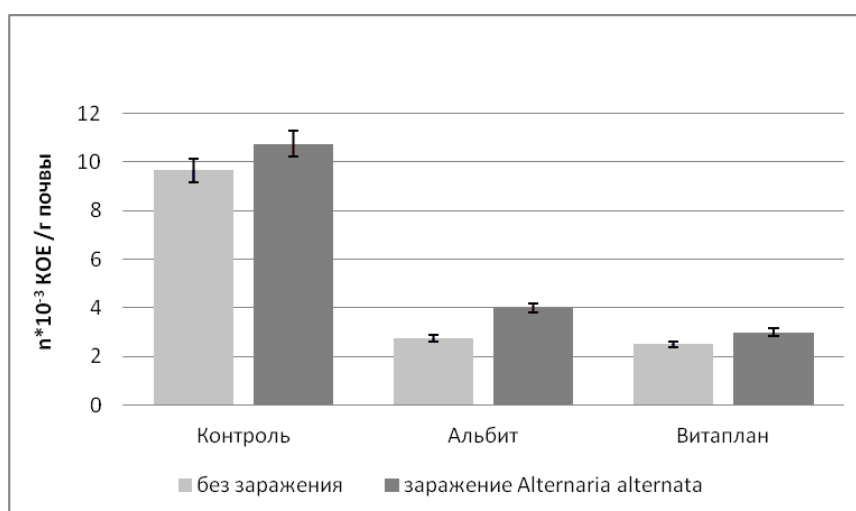


Рис. 3. Изменение численности микромицетов в ризосфере сахарной свеклы в условиях заражения *A. alternata*.

Таким образом, проведенные исследования показали, что влияние биопрепаратов оказалось неодинаковым на разные группы микроорганизмов. Применение пре-

парата, в основу которого положен микробный метаболит, стимулировало рост гетеротрофных бактерий и биомассы самих растений. Использование биопрепаратов ингибировало развитие микромицетов и денитрификаторов. Данный процесс весьма благоприятен для почвы, так как приводит к уменьшению вероятности возможного развития фитопатогенных грибов потере доступного для организмов азота. Однако опосредованное влияния Витаплана на ризосферы микроорганизмы проявилось сильнее, чем при обработке растений Альбитом. Это связано в первую очередь тем, что Витаплан представляет собой живую массу бактерий, которые могут вступать в конкурентные, синергические и антагонистические отношения с аборигенным микробоценозом почвы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаренко В.А. Современная защита растений и ее научное обеспечение // Агро XXI. -2003.-№ 1-6. С. 34-39.
2. Хайруллин Р.М., Недорезков В.Д., Уразбахтина Н.А. и др. Пути повышению устойчивости пшеницы к болезням эндофитными штаммами *Bacillus subtilis* // Индуцированный иммунитет сельскохозяйственных культур – важное направление защите растений. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – СПб.: 2006. – С. 58-61.
3. Голицин А.Н. Промышленная экология и мониторинг загрязнения природной среды. М.: Оникс, 2007. - С. 336.
4. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Почвенная микробиология. – М: Дрофа, 2006. - 444 с.
5. Игнатов С.И., Багирова С.Ф. Антагонисты патогенных микроорганизмов филлосферы // Защита и карантин растений. -1998. №2.-С. 62.
6. Казначеев М.Н. Биопрепараты на службе урожая //Защита и карантин растений. - 2000. - № 7. - С. 14.
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под. ред. Д.Г.Звягинцева. - М.: МГУ, 1991. 304с.
8. Умаров А.А., Вешкурова О.Н., Султанова Э.М., Салихов Ш.И. Новые регуляторы роста на основе биогумуса продукта вермикультивирования //Агрохимия. - 2002. - № 2. - С. 42 - 46.
9. Злотников А.К., Алехин В.Т., Андрианов А.Д. Биопрепарат Альбит для повышения урожая и защиты растений: опыты, рекомендации, результаты применения. – М: ООО «Издательство Агрорус». – 2008. – 248 с.
10. Кирсанова Е.В., Цуканова З.Р., Борзенкова Г.А., Тиняков Л.А., Злотников А.К. Применение препаратов группы Альбит на яровом ячмене в Орловской области //Повышение устойчивости производства сельскохозяйственных культур в современных условиях: Сборник научных материалов.- Орел: 2008.- С.148-156.

УДК 632.937

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *B. SUBTILIS* В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ОТ ТВЕРДОЙ ГОЛОВНИ И КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ

Иргалина Р.Ш.¹, Хайруллин Р.М.²

¹ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ,

²Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г.Уфа, Россия

Введение

Урожайность и качество зерна яровой пшеницы во многом определяется семенной инфекцией, которая представляет собой, как правило, комплекс фитопатогенных грибов и бактерий. К числу наиболее распространенных и вредоносных болезней культуры относятся: твердая и пыльная головня, корневые гнили, септориоз, бурая листовая ржавчина, мучнистая роса.

По данным В.А. Чулкиной с соавторами [19] через семенной и посадочный материал в агроэкосистемах однолетних сельскохозяйственных культур передается 75% возбудителей грибной природы. В связи с этим важнейшим качеством семенного и посадочного материала служит их здоровье, характеризующееся отсутствием возбудителей на (в) семенном материале или заражением (заселением) его ниже порога вредности [4, 15, 20].

Корневые гнили зерновых культур в настоящее время широко распространены. Потери от них иногда достигают 50% урожая зерна и более [2, 3, 5]. В среднем же потери зерна от грибной инфекции корней оцениваются в 25% от потенциального урожая [13].

Иммунных к корневым гнилям и головневым болезням и сортов и линий яровой пшеницы к сожалению нет, в связи с чем особое место в их защите от болезней должны занять семеноводство и агротехнические мероприятия, способствующие ограничению развития этих болезней, среди которых основным остается предпосевное протравливание семян.

Обработка семян современными фунгицидами способствует защите растений не только на стадии прорастания, но и в процессе последующих этапов развития. Этот метод отвечает основному принципу интегрированной защиты – максимальный эффект при минимально отрицательном влиянии на компоненты агроценоза, так как препарат вносится только туда, где он действительно необходим [17].

Известно, что химические протравители оказывают негативные последствия на окружающую среду, применение фунгицидов с одним и тем же действующим веществом в течение нескольких лет подряд способствует появлению среди фитопатогенов устойчивых форм [8].

В связи с этим актуальным является ограничение применения химических фунгицидов, поиск и создание экологически малоопасных препаратов биологического происхождения с малой дозой расхода, меньшей опасностью для окружающей среды, биологизация и экологизация сельскохозяйственного производства, целью которых является получение высоких урожаев при максимальном использовании агробиологических приемов, снижения уровня инфекционного потенциала [8, 12, 16, 17].

Одним из новых направлений является использование в качестве основы биопрепаратов эндофитных штаммов бактерий, например вида *B. subtilis* [2, 8, 9, 10, 11, 12, 18]. В связи с этим нами оценивалась эффективность применения новых эндофитных штаммов *B. subtilis* в защите пшеницы от возбудителей твердой головни и корневых гнилей.

Методика

Основными объектами исследований являлись возбудитель твердой головни гриб *Tilletia tritici* (DC) Tul., а также корневые гнили пшеницы, вызываемые в Республике Башкортостан преимущественно грибами *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. и *Fusarium oxysporum* Schltdl. В работе использовался сорт яровой мягкой пшеницы Омская 35.

В качестве средств защиты растений оценивалась биологическая эффективность ряда потенциальных биофунгицидов на основе новых эндофитных антагонистических штаммов *B. subtilis* (предоставлены сотрудниками лаборатории биотехнологии ФГБОУ ВПО «Башкирский ГАУ»). Обработка семян препаратами, входящими в Государственный каталог... (2010) проводилась исходя из рекомендованных норм. Расход биофунгицидов на основе новых штаммов бацилл – 1 л/т при титре спор и клеток 1-3 млрд./мл. Расход рабочей жидкости – 10 л/т.

Изучение способности эндофитных штаммов бактерий подавлять рост головневого гриба оценивали следующим способом. Зерновку, пораженную головней, с ненарушенной семенной оболочкой стерилизовали 3 минуты в 70%-ном этаноле, затем обжигали на пламени спиртовки. В асептических условиях разрезали семенную оболочку и выделяли споры. В контроле их раскладывали на смоченную минеральной средой Чапеке фильтровальную бумагу. В опыте среду разбавляли 1:1 культуральной жидкостью 2-х суточных культур штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 11РН, *B. subtilis* 49РН, *B. subtilis*, 89РН и *B. subtilis* 118РН – наиболее сильных антагонистов против фузариевых грибов [6]. Затем споры проращивали при 10-12°C, наблюдая каждый день за их прорастанием.

Полевые опыты проводили в учебно-научном центре Башкирского ГАУ в 2007 г. Эталонами служили протравитель Фитоспорин-М и Гуми 20 (ООО НВП «БашИнком»). Контрольные семена обрабатывали водой. Инфекционный фон формировали, заражая семена спорами гриба *T. caries* из расчета 0,3 г спор на 100 г семян. Агротехника возделывания пшеницы была общепринятой для южной лесостепной зоны республики. Делянки площадью 1 м² размещались систематически, в трех повторностях. Посев производился вручную. Оценку поражения растений корневыми гнилями и твердой головней проводили по методике, описанной ВИЗР [14]. Обработку результатов исследований проводили по методике полевого опыта [1].

Результаты и обсуждение

Все изученные штаммы бактерий подавляли прорастание спор фитопатогена (рис. 1). Таким образом, нам впервые удалось выявить способность эндофитных штаммов *B. subtilis* ингибировать прорастание спор этого гриба *in vitro*. Полученные результаты дали основание для испытания экспериментальных препаратов на основе имеющихся штаммов бактерий в полевых условиях.

Применение гуматов в чистом виде и совместно с бактериями повышало поражение растений яровой пшеницы головней (табл.1). Наиболее восприимчивыми к данному патогену были растения, выросшие на делянках с вариантами совместного при-

менения гуматов 11В+Гуми 20 (распространение головни 24,7%), 11ВМ+Гуми 20 (19,4%), Гуми 20 (18,7%), 118РН+ Гуми 20 (14,5%). При протравливании семян только штаммами бактерий наиболее эффективным в защите пшеницы был штамм 11В (эффективность 83,5%). Другие штаммы также показали достаточно высокую эффективность на искусственном инфекционном фоне: 118РН (79,8%), 811РН (76,1%), 122РН (72,9%), 832РН (69%), 871РН (66,7%). За ними по эффективности можно расположить эталонный препарат Фитоспорин-М (60,4%). Наименьший защитный эффект против возбудителя твердой головни пшеницы проявился у штаммов 121РН и 171РН.

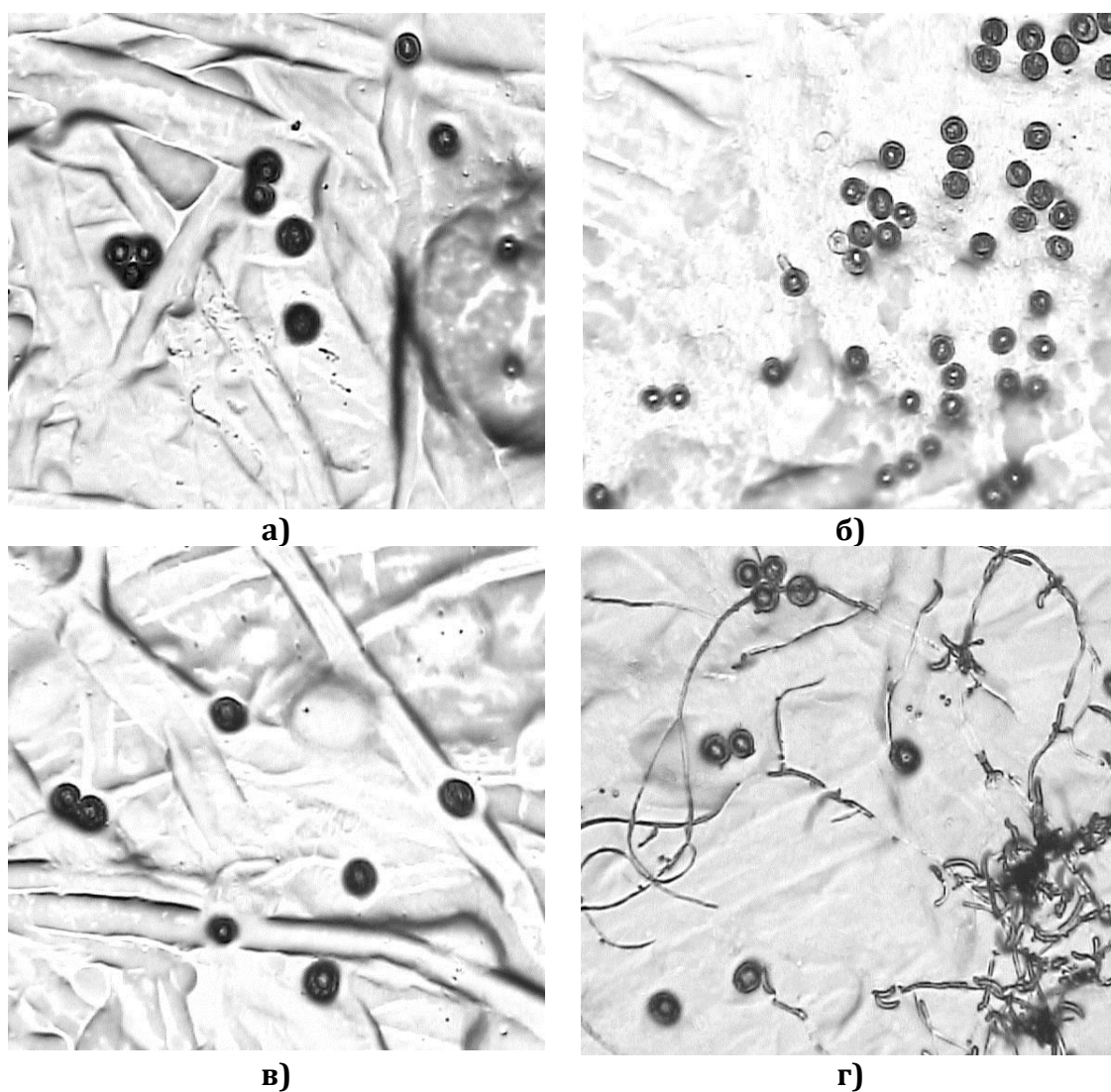


Рис. 1. Влияние метаболитов эндофитных штаммов *B. subtilis* на прорастание спор возбудителя твердой головни *T. caries*. А – штамм 26Д, б) –штамм 89РН, в) – штамм 118РН, г)- контроль (прорастание спор).

Таблица 1.

Влияние обработки семян экспериментальными биопрепаратами на поражение пшеницы сорта Омская 35 твердой головней.

Вариант	Распространение, %	Биологическая эффективность, %
Контроль	6,7±0,1	-
Фитоспорин-М	1,8±2,1	73,1
11В	0,8±1,1	88,0
11В+ Гуми 20	24,7±1,4	-
11РН	0,9±1,0	86,5
11РН+ Гуми 20	2,5±1,2	62,7
11ВМ	2,9±3,0	37,6
11ВМ+ Гуми 20	19,4±1,2	-
118РН	3,8±4,6	43,3
118РН+ Гуми 20	14,5±1,3	-
Гуми 20	18,7±1,2	-
122РН	1,3±0,6	80,6
141РН	2,8±3,3	58,2
811РН	1,1±1,9	83,6
832РН	1,4±0,8	79,1
871РН	1,5±1,8	77,6

Нами оценивалось также развитие и распространенность корневых гнилей на опытных делянках в фазу молочно-восковой спелости растений (табл. 2). Применение всех препаратов вело к снижению, примерно на 30%, степени поражения и распространения корневых гнилей, как на контрольном фоне (без обработки семян спорами возбудителя твердой головни), так и на инфекционном. Наиболее эффективными на контрольном фоне оказался препарат на основе штамма 811РН (степень развития 6,9%). На инфекционном фоне среди других препаратов выделялись по эффективности баковая смесь 11ВМ+Гуми 20 (7,7% развития), Гуми 20 (8,1%) и Фитоспорин-М (9,2%). По влиянию на степень распространения болезни препараты мало различались между собой. Интересно отметить, что при добавлении Гуми 20 к некоторым штаммам бактерий эффективность применения такой баковой смеси повышалась (табл. 3), но на инфекционном фоне была ниже, чем при использовании биологического эталона Фитоспорин-М.

На инфекционном фоне наблюдалась тенденция повышения поражения растений корневыми гнилями, в сравнении с контрольным фоном. Таким образом, поражение растений твердой головней повышало развитие корневых гнилей.

Таблица 2.

Влияние обработки семян экспериментальными препаратами бактерий на поражение пшеницы сорта Омская 35 корневыми гнилями.

Вариант	Контрольный фон		Инфекционный фон	
	Распространение, %	Развитие, %	Распространение, %	Развитие, %
Контроль	39,3	20,9	39,9	25,1
Фитоспорин-М	20,4	12,4	23,9	9,2
11В	20,9	12,2	25,2	12,8
11В+ Гуми 20	24,2	13,6	25,9	16,1
11РН	21,3	12,3	19,9	11,7
11РН+ Гуми 20	19,9	10,4	23,9	10,7
11ВМ	18,0	12,4	22,2	13,2
11ВМ+ Гуми 20	23,7	15,4	17,4	7,7
118РН	26,1	14,0	26,8	14,5
Гуми 20	22,2	11,3	14,5	8,1
122РН	20,7	11,6	21,6	13,1
141РН	26,1	11,6	21,3	12,2
811РН	17,9	6,9	23,0	13,5
832РН	23,7	11,3	26,7	15,3
871РН	26,5	12,4	18,8	11,5
Среднее значение при обработке семян препаратами	20,8	11,2	22,1	12,0

Таблица 3.

Влияние обработки семян баковой смесью экспериментальных биофунгицидов с препаратом Гуми 20 с на поражение пшеницы сорта Омская 35 корневыми гнилями (среднее значение всех вариантов).

Вариант	Контрольный фон		Инфекционный фон заражения семян возбудителем твердой головки	
	Распространение, %	Развитие, %	Распространение, %	Развитие, %
Без Гуми 20	22	13	24	13
С препаратом Гуми 20	17	10	22	11

Анализ урожайности выявил, что обработка семян всеми препаратами повышала урожайность культуры на делянках как контрольного, так и инфекционного фонов (табл.4). Наиболее эффективными в повышении урожайности зерна при обработке семян, не зараженных спорами возбудителя твердой головки, были штаммы 11В, 11ВМ, 141РН.

Прибавка урожайности в пересчете на 1 га составляла 2,5-2,8 ц/га. Обработка семян двумя последними штаммами способствовала сохранности растений к уборке, так что число продуктивных стеблей повышалось в сравнении с контролем на 10% при использовании штамма 11ВМ и на 14,6% - штамма 141РН.

Всероссийская конференция «Биотехнология – от науки к практике»
 СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
 УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Таблица 4.

Влияние обработки семян бактериальными препаратами на урожайность зерна яровой пшеницы сорта Омская 35 и ее структуру.

Вариант	Число продуктивных стеблей, шт./м ²	Масса зерна 1 колоса, г	Масса 1000 зерен, г	Урожайность, ц/га	Прибавка, ц/га
Контрольный фон					
Контроль	416	0,49	26,5	15,5	-
Фитоспорин-М	466	0,44	26,4	15,6	0,1
11В	442	0,55	28,1	18,2	2,7
11В+ Гуми 20	473	0,45	26,3	16,1	0,6
11РН	500	0,46	27,5	17,1	1,6
11РН+ Гуми 20	475	0,46	28,1	16,6	1,1
11ВМ	510	0,48	28,3	18,3	2,8
11ВМ+ Гуми 20	472	0,45	26,7	15,9	0,4
118РН	482	0,45	26,9	16,4	0,9
Гуми 20	481	0,43	26,7	15,5	-
122РН	449	0,46	27,4	15,8	0,3
141РН	532	0,45	28,1	18,0	2,5
811РН	483	0,45	27,4	16,3	0,8
832РН	492	0,48	26,9	16,6	1,1
871РН	453	0,50	27,6	16,8	1,3
НСР ₀₅	1,31				
Инфекционный фон					
Контроль	464	0,33	27,1	11,6	-
Фитоспорин-М	510	0,40	27,2	14,8	3,2
11В	428	0,50	26,7	15,9	4,3
11В+Гуми 20	411	0,47	27,5	14,6	3,0
11РН	515	0,41	27,2	15,8	4,2
11РН+Гуми 20	458	0,46	26,9	16,0	4,4
11ВМ	513	0,45	27,4	17,4	5,8
11ВМ+Гуми 20	439	0,46	26,8	15,3	3,7
118РН	425	0,49	26,7	15,5	3,9
Гуми 20	356	0,56	26,3	15,0	3,4
122РН	415	0,49	26,9	15,5	3,9
141РН	485	0,47	27,6	17,3	5,7
811РН	462	0,46	26,3	16,0	4,4
832РН	447	0,52	27,4	17,4	5,8
871РН	466	0,47	27,6	16,6	5,0
НСР ₀₅	1,29				

Таким образом, среди выделенных в лаборатории биотехнологии БГАУ эндофитных антагонистических штаммов *B. subtilis* имеются перспективные в качестве основы новых полифункциональных биофунгицидов для обработки семян яровой пшеницы. Среди них по показателю повышения урожайности культуры можно выделить штамм *B. subtilis* 11ВМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов – М.: «Колос», 1985. – С.175-178.
2. Иргалина, Р.Ш. Биологическое обоснование защиты пшеницы от корневых гнилей и твердой головни в Предуралье Республики Башкортостан [Текст] : автореферат дис. канд. биол. наук : 06.01.07 / Р.Ш.Иргалина - Кинель, 2012. - 22 с. - Библиогр.: с. 21-22.
3. Исаев; Р.Ф. Эффективность применения биологических и антистрессовых препаратов на посевах яровой пшеницы [Текст]. Р.Ф. Исаев, Л.И. Гришина // Агрехимический вестник. — 2007. — №6. С. 32-33.
4. Каплин, В.Г. Фитосанитарный контроль и защита семян зерновых злаковых культур от болезней и вредителей [Текст] / В.Г.Каплин [и др.]. Самара: Самарская ГСХА, 2000. - 108 с.
5. Кошелева, А.Б. Эффективность различных методов предпосевной обработки семян зерновых культур в борьбе с болезнями / А.Б.Кошелева [и др.] // Проблемы защиты растений в Поволжье: материалы первой региональной научно-практической конференции // Кинель, 2002. – С.28-33.
6. Кутлубердина Д.Р. Антагонистические штаммы *Bacillus subtilis* Cohn как агенты биоконтроля грибов рода *Fusarium* Link [Текст] : / Д.Р. Кутлубердина // Автореф. дисс. канд. биол. наук. – Саратов, 2010. - 22 с.
7. Мелентьев, А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах / А.И. Мелентьев// – М. : Наука, 2007. – 147с.
8. Монастырский О.А. Биологизация защиты растений: отставание России становится все более очевидным / О.А. Монастырский // Защита и карантин растений. - 2007. №3. – С. 20-21.
9. Надыкта В.Д. Перспективы биологической защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов / В.Д. Надыкта // Защита и карантин растений. 2004. - № 6. - С.26-28.
10. Недорезков, В.Д. Биологическая защита пшеницы от болезней в условиях Южного Урала / В.Д. Недорезков // М.: Изд-во МСХА, 2002. – 173 с.
11. Недорезков, В.Д. Биологическое обоснование применения эндофитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале / В.Д. Недорезков // Автореф. дисс. д-ра. с.-х. наук. – Уфа, 2003. – 48 с.
12. Новожилов, К.В. Некоторые направления экологизации защиты растений / К.В. Новожилов // Защита и карантин растений 2003. - № 8. –С. 14-17.
13. Павлюшин, В.А. Стратегические задачи исследований по обеспечению фитосанитарного оздоровления агроэкосистем в условиях адаптивно-ландшафтного земледелия./ В.А. Павлюшин // Фитосанитарное оздоровление экосистем : материалы II Всероссийского съезда по защите растений // С.-Пб. – Пушкин, 2005.–Том2.–С.544-547.
14. Санин, С.С. Методические указания по проведению производственных демонстрационных испытаний средств и методов защиты зерновых культур от болезней / С.С. Санин [и др.] // Защита и карантин растений. – 2004. – Приложение. – 23 с.
15. Сергеев В.Р (Ред.). Протравливание семян зерновых культур. (Рекомендации ВНИИ защиты растений) - Защита и карантин растений. – 1999. - № 2 – 23 с.
16. Тютюрев, С.Л. Совершенствование химического метода защиты сельскохозяйственных культур от семенной и почвенной инфекции / С.Л. Тютюрев // СПб.: ВИЗР, 2000. – 251 с.

17. Тютюрев, С.Л. Индуцированный иммунитет к болезням и перспективы его использования / С.Л. Тютюрев // Защита и карантин растений. – 2005. - №4. – С. 21-26.
18. Хайруллин Р.М. Биологические особенности эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* как перспективной основы новых биопрепаратов / Р.М. Хайруллин [и др.] // Аграрная Россия. – 2011. - № 1. – С. 49-53.
19. Чулкина, В.А. Орган - рецептор инфекции и его значение при диагностике заболеваний / В.А. Чулкина [и др.] // Защита и карантин растений. - 2007. - №5. – С.36-38.
20. Яковлев, И.Д. Влияние семенной инфекции на поражение яровой пшеницы корневыми гнилями / И.Д. Яковлев [и др.] // Защита и карантин растений. - 2006. - № 2. - С.57-59.

УДК 633.1:632.938.1

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ И УРОЖАЙНОСТЬ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

Исаев Р.Ф., Иргалина Р.Ш.

ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа, Россия

Введение

Протравливание семян играет важную, а иногда решающую роль в профилактике грибных и бактериальных болезней. Установлено, что протравливание на 60-100% ограничивает проявление семенной инфекции, на 30-80% - первичной аэрогенной, содержащейся в почве и в пожнивных остатках, и в конечном итоге обеспечивает прибавку урожая зерновых культур, в зависимости от условий года, на 2-6 ц/га, что позволяет в 3-6 раз окупить затраты на обработку [1, 10, 5, 2].

Современные протравители помимо защиты от фитопатогенов способствуют формированию здоровой и хорошо развитой корневой системы, которая даже при экстремальных условиях более эффективно усваивает почвенную влагу и растворенные в ней элементы питания. Однако известно, что некоторые протравители семян при недостатке влаги в почве могут проявлять ретардантный эффект, особенно при посеве семян пшеницы с генетически детерминированным коротким колеоптиле, на глубину более 5 см [4, 11].

Наряду с явным положительным эффектом протравителей семян, в определенных условиях проявляется и их негативный эффект, что заставляет исследователей искать новые комбинации действующих компонентов, а также использовать баковые смеси химических протравителей и биологических регуляторов роста и устойчивости растений, как для снижения пресса химических экотоксикантов на агроэкосистемы, так и повышения эффективности фунгицидов в стимуляции роста и продуктивности растений. [10, 7, 9, 6].

Материалы и методы

В связи с вышеуказанными положительными и отрицательными обстоятельствами, в 2012-2013 гг. нами были испытаны композиционные смеси широко применяемого в

Южной лесостепной зоне РБ протравителя из триазолового ряда Дивиденд Стар (норма расхода 0,75 л/т) и регуляторов роста с некоторыми микроэлементами.

Объектом исследований был сорт яровой пшеницы Башкирская-24. Площадь делянок 10 м², повторность 4-х кратная, размещение делянок систематическое. Все учеты и наблюдения проводились по общепринятым методикам [3, 8].

Комплекс протравителей подобран нами так, чтобы в условиях почвенной засухи он был бы эффективен не только против возбудителей корневых гнилей и нетоксичен для растений, но и способствовал бы включению у растений механизма стрессоустойчивости и обеспечивал повышение урожайности культуры.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о достаточно высокой эффективности химического протравителя и регуляторов роста в сочетании с микроэлементами в отношении возбудителей корневых гнилей и урожайности пшеницы. Так, во всех вариантах предпосевной обработки семян, на фоне существенного развития возбудителей корневых гнилей в контроле (35,8%), заметно снижалась интенсивность поражения посевов, а также наблюдалось достоверное повышение урожайности культуры. Как и следовало ожидать, наибольшую биологическую эффективность против возбудителей корневых гнилей проявил химический протравитель Дивиденд Стар, особенно в комплексе с бором.

Таблица 1.

Влияние химического протравителя и стимуляторов роста в сочетании с микроэлементами на элементы структуры урожая и урожайность яровой пшеницы (сорт Башкирская-24, Учхоз БГАУ, 2012- 2013 гг)

№ п/п	Вариант	Длина колоса, см	Число продуктивных стеблей, шт	Число зерен в колосе, шт.	Вес зерна с 1 колоса, г	Масса 1000 зерен, г	Б.У., ц/га	Корневые гнили, %
1	Контроль	5,5	428	9,2	0,30	32,6	12,2	35,8
2	Гуми-20	5,5	434	10,8	0,36	33,3	13,4	23,1
3	Крезацин	5,8	432	10,0	0,32	32,0	13,8	23,7
4	Дивиденд Стар, к.с. (0,75 л/т)	5,2	427	10,2	0,33	31,8	15,4	12,1
5	Гуми-20 + Zn	5,5	434	11,2	0,33	37,8	15,5	14,3
6	Крезацин + Zn	5,5	438	11,4	0,31	37,2	14,8	14,6
7	Дивиденд Стар, к.с. (0,75 л/т) + Zn	6,3	438	10,6	0,36	34,0	15,8	10,6
8	Гуми-20 + Mn	5,6	430	10,6	0,35	32,9	14,6	15,3
9	Крезацин + Mn	5,9	438	10,6	0,37	34,9	16,9	18,6
10	Дивиденд Стар, к.с. (0,75 л/т) + Mn	5,6	434	10,1	0,33	32,4	14,2	11,7

Всероссийская конференция «Биотехнология – от науки к практике»
**СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
 УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ**

11	Гуми-20 + Cu	5,6	435	10,7	0,35	35,5	16,2	18,9
12	Крезацин + В	6,7	436	10,6	0,36	35,4	15,7	20,8
13	Дивиденд Стар, к.с. (0,75 л/т) + В	5,8	442	10,9	0,35	34,8	16,8	10,3
	НСР ₀₅						1,0	

Биологическая эффективность регуляторов роста и развития растений по этому показателю была значительно ниже. Однако, в комплексе с микроэлементами, их фунгистатическое действие существенно повышалось. Так, препараты Гуми-20 и Крезацин, в сочетании с микроэлементом Zn показали результат, ненамного уступающий в этом отношении химическому протравителю – 14,3%, 14,6% и 10,6%, соответственно.

Аналогичные показатели наблюдались и в отношении урожайности пшеницы в опыте. Во всех вариантах обработки этот показатель существенно превышал таковой в контроле (12,2 ц/га). Наиболее высокую эффективность в этом отношении проявили варианты: Гуми-20 + Cu (прибавка к контролю составила 4,0 ц/га), Крезацин + Mn (прибавка к контролю составила 4,7 ц/га), Дивиденд Стар + В (прибавка к контролю составила 4,6 ц/га).

Заключение

Таким образом, применение при предпосевной обработке семян природного (Гуми-20) и синтетического (Крезацин) регуляторов роста позволяет не только снижать степень развития в посевах пшеницы возбудителей корневых гнилей, но и заметно повышать урожайность культуры, не нарушая при этом экологическое состояние агроценоза. Микроэлементы, используемые в защитно-стимулирующих составах позволяют существенно повысить эффективность протравливания семян как в отношении возбудителей корневых гнилей, так и урожайности культуры. В то же время следует отметить, что для каждого регулятора роста или же химического протравителя следует подбирать оптимальное сочетание с определенным микроэлементом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амирханов, Д.В. Протравливание семян прием обязательный/ Д. В. Амирханов, Р.Ф. Исаев, А. Х.Нугуманов и др.// Защита и карантин растений. - 2001. - №5.
2. Долженко, В.И. Протравливание семян зерновых культур /В.И. Долженко, Г.И. Сухорученко, Л.Д. Гришечкина, Л.А. Буркова, А.И. Силаев, С.Д. Здрожевская, Е.Б. Белых, А.С. Комарова //Приложение к журналу "Защита и карантин растений". - 2014. -№2014.
3. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов – М.: «Колос», 1985. – С.175-178.
4. Жученко, А.А. Ресурсный потенциал производства зерна в России (теория и практика) / А.А. Жученко // – М.: ООО «Изд-во Агрорус», 2004. - 110 с.
5. Зазимко, М.И. Патогенный комплекс на озимой пшенице / М. И. Зазимко, Э. И Монастырская, В. С. Горковенко // Защита и карантин растений. — 2003. -№3.
6. Иргалина, Р.Ш. Защитный эффект препарата Фитохит Т на посевах пшеницы в условиях Республики Башкортостан / Р.М. Хайруллин, С.Л. Тютюрев, Р.Ф. Исаев // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Индукцированный иммунитет сельскохозяйственных культур – важное направление в защите растений». – Большие Вяземы Московской обл., 2006. – С.88-89.

7. Марьина-Черемных, О.Г. Биоэкологическое обоснование защиты зерновых культур от корневых гнилей на Северо-Востоке НЧЗР / О.Г. Марьина-Черемных // Автореф. дисс. докт. с. - х. наук. - Самара, 2008. - 42 с.
8. Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян сельскохозяйственных культур. М., 1985. – 130 с.
9. Порсев, И.Н. Адаптивные фитосанитарные технологии возделывания основных сельскохозяйственных культур в условиях Зауралья // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук Краснодар, - 2010, - С. 38.
10. Тютюрев, С.Л. Индуцированный иммунитет к болезням и перспективы его использования / С.Л. Тютюрев // Защита и карантин растений. – 2005. - №4. – С. 21-26.
11. Чулкина, В.А. Орган - рецептор инфекции и его значение при диагностике заболеваний / В.А. Чулкина [и др.] // Защита и карантин растений. - 2007. - №5. – С.36-38.

УДК 504.73.054

ВЛИЯНИЕ БИОПЛЕНОК *NOSTOC COMMUNE* НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Коваль Е. В. ¹, Огородникова С. Ю. ^{1,2}

¹Вятский государственный гуманитарный университет, г. Киров, Россия

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия

Многочисленными исследованиями доказано, что цианобактерии (ЦБ) обладают адаптационными, биоремедиационными и антагонистическими способностями [1]. В сельском хозяйстве активно используются препараты на основе ЦБ как ростстимулирующее и протекторное средство [2]. Природные наземные цианобактериальные пленки – более устойчивы к стрессовым факторам, в отличие от альгологически чистых культур [3].

Nostoc commune – многовидовые структурированные сообщества с большой плотностью клеток организмов различных систематических уровней, являются одними из самых активных колонизаторов пространства. *N. commune* относится к космополитам, обитающим в любом регионе планеты [3]. Выявлена высокая устойчивость *N. commune* к поллютантам. Так, показана способность *N. commune* расти и развиваться при дозах нефти до 10% от массы почвы [4]. Возможно, уникальные экологические особенности *N. commune* обусловлены его способностью становиться эдификатором многовидовых альго-цианобактериальных ценозов с богатым спектром гетеротрофных спутников [5].

Метилфосфоновая кислота (МФК) – конечный продукт гидролиза и универсальный маркер фосфорсодержащих отравляющих веществ. МФК персистентна в природных условиях за счет наличия стабильной углерод-фосфорной (С-Р) связи, устойчивой к химическому гидролизу, тепловому разрушению, а также к фотолизу [6,

7]. Даже в малых концентрациях МФК оказывает влияние на растения и почвенную микрофлору [8, 9].

Цель работы – изучить влияние обработки семян ячменя биопленками *N. commune* на биохимические и ростовые показатели растений, выращенных в условиях загрязнения МФК.

Объектами исследования были растения ячменя сорта Новичок и биопленки *N. commune*. Семена ячменя проращивали в чашках Петри на дистиллированной воде в присутствии ЦБ и без них, для опытов использовали. 2-месячную суспензию ЦБ. Семидневные проростки ячменя пересаживали в сосуды на водную среду, в качестве которой использовали питательный раствор Кнопа (контроль), растворы МФК, приготовленные на растворе Кнопа: $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л (0,5 мМ) и $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (1 мМ).

Изучали влияние обработки семян ЦБ на показатели жизнедеятельности растений, выращенных в присутствии МФК, по биохимическим показателям: интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), содержание антоцианов и показателям линейного роста растений.

Интенсивность ПОЛ анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), который образуется в процессе ПОЛ [10]. Содержание антоциановых пигментов в листьях ячменя определяли спектрофотометрически по методике Муравьевой (510, 657 нм) [11]. Для изучения влияния МФК на ростовые процессы отбирали по 20 растений каждого варианта, разделяли по органам, измеряли длину корней и побегов.

Накопление в растительных клетках продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) является симптомом, характеризующим степень окислительных повреждений в растительных клетках.

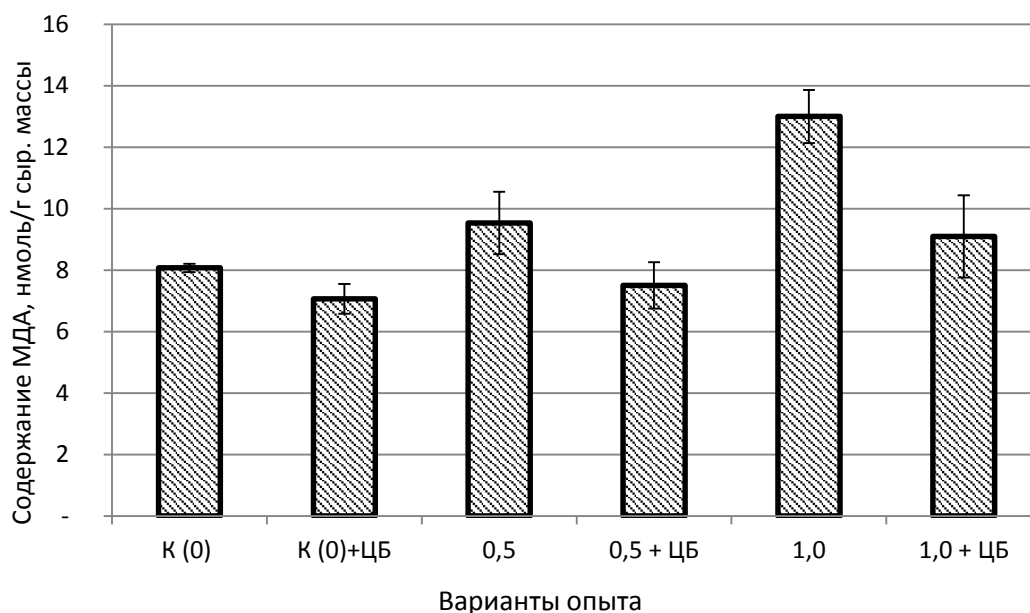


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида в листьях ячменя. Здесь и далее варианты опыта: К(0) – контроль; К(0)+ЦБ – обработка ЦБ; 0,5 – 0,5 мМ МФК; 0,5+ЦБ – обработка ЦБ и 0,5 мМ МФК; 1,0 – 1 мМ МФК; 1,0+ЦБ – обработка ЦБ и 1,0 мМ МФК.

МФК вызывала активацию процессов ПОЛ в листьях ячменя (рис. 1). В опытах с 0,5 и 1 мМ МФК содержание МДА в растительных клетках было выше на 20 и 60% соот-

ветственно, по сравнению с контролем. Предварительная обработка семян *N. commune* способствовала уменьшению интенсивности окислительных процессов в растительных тканях. В условиях загрязнения МФК отмечали снижение интенсивности процессов ПОЛ в листьях растений, семена которых были обработаны *N. commune*, по сравнению с необработанными.

Антоцианы являются низкомолекулярными антиоксидантами, входящими в состав стресс-защитной системы растений. Накопление антоцианов является неспецифической реакцией на стрессовые условия произрастания [12]. Накопление антоцианов в растительных клетках отмечали при действии МФК самой высокой концентрации 1мМ (рис. 2), что свидетельствует о развитии окислительных процессов в растительных клетках и подтверждается данными по накоплению продуктов ПОЛ. Возможно, возрастание содержания антиоксидантного пигмента в опыте с 1мМ МФК направлено на уменьшение уровня активных форм кислорода в клетках. Обработка семян биопленками *N. commune* приводила к меньшему накоплению антоцианов в листьях растений выращенных как в присутствии МФК, так и без нее. По-видимому, инокуляция семян *N. commune* способствует снижению интенсивности окислительных процессов в растительных клетках в норме и в стрессовых условиях, что подтверждается тесной положительной корреляцией между активностью процессов ПОЛ и уровнем антоцианов ($r = 0,79$).

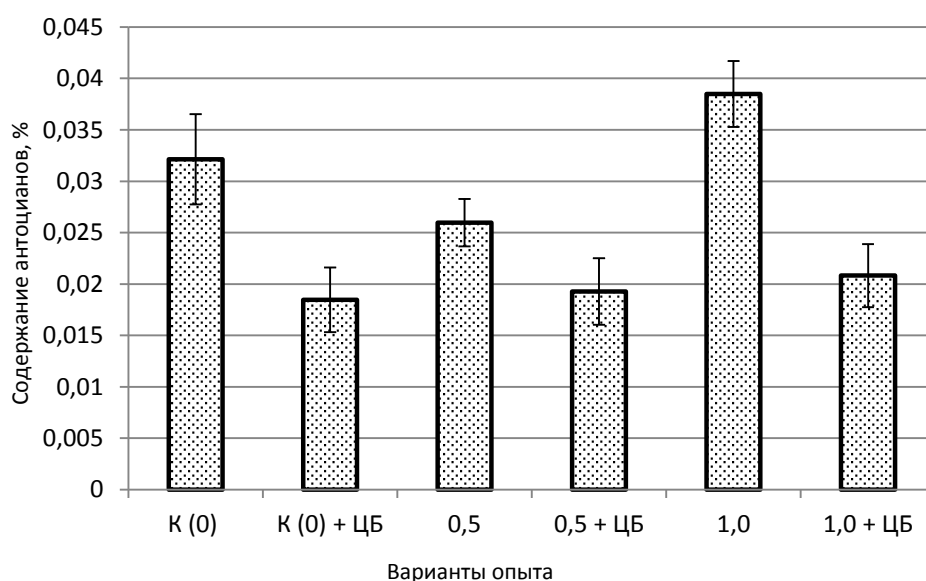


Рис. 2. Содержание антоцианов в листьях ячменя

Также уровень стресса и адаптацию растений к условиям произрастания можно оценить по показателям роста. Было отмечено торможение роста побегов при воздействии МФК, длина корней была близка к контролю (рис. 3). Обработка семян биопленками *N. commune* приводила к активации ростовых процессов, причем в большей степени ростостимулирующий эффект проявился в варианте с действием 1мМ МФК. Отмечена значительная отрицательная корреляционная зависимость ($r = - 0,6$) между интенсивностью ПОЛ и длиной побегов ячменя.

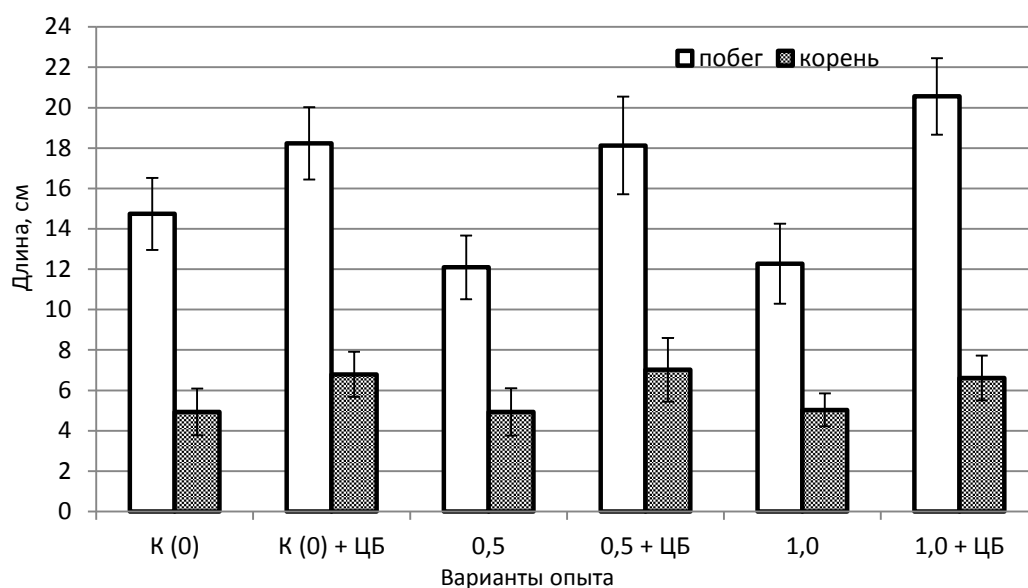


Рис. 3. Линейный рост органов ячменя

Инокуляция семян *N. commune* стимулировала рост корней ячменя в среднем на 40% по отношению к контролю. Вероятно, ростстимулирующий эффект связан с экзоосмосом клетками ЦБ ауксино- и гиббериллиноподобных веществ [2].

Таким образом, МФК оказывает негативное влияние на растения ячменя, что проявилось в активации процессов ПОЛ и снижении линейного роста побегов. Обработка семян *N. commune* оказывала защитное действие на растения, что проявляется в снижении степени окислительных повреждений в клетках (уменьшение уровня МДА и антоцианов) и стимуляции роста растений. В целом, биопленки *N. commune* оказывают протекторное действие на растения в условиях загрязнения среды выращивания МФК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Домрачева, Л.И. Цветение почвы и закономерности его развития [Текст] / Л.И. Домрачева. – Сыктывкар, 2005. – 336 с.
2. Трефилова, Л.В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии: автореф. дис. канд. биол. наук / Трефилова, Л.В. – Саратов: 2008. - 26 с.
3. Домрачева, Л.И. Биопленки *Nostoc commune* – особая микробная сфера [Текст] / Л.И. Домрачева, Л.В. Кондакова, О.А. Пегушина, А.И. Фокина // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – № 1. – С. 15 – 20.
4. Киреева, Н.А. Фитотоксичность антропогенно загрязнённых почв [Текст] / Н.А. Киреева, Г.Г. Кузяхметов, А.М. Мифтахова, В.В. Водопьянов. – Уфа: Гилем, 2003. – 266 с.
5. Domracheva, L. I. Algal-micological complexes in soils upon their chemical pollution / L. I. Domracheva, E. V. Dabakh, L. V. Kondakova, A. I. Varaksina (A. I. Fokina) // Eurasian Soil Science, 2006. – V. 39. – P. 91–97.
6. Савельева, Е.И. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии [Текст] / Е.И. Савельева, И.Г. Зенкевич, Т.А. Кузнецова, А.С. Радиллов, Г.В. Пшеничная // Российский химический журнал. – 2002. Т. XLVI. – № 6. – С. 82 – 91.
7. Кононова, С.В. Фосфонаты и их дегградация микроорганизмами [Текст] / С.В. Кононова, М.А. Несмеянова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. Вып. 2. – С. 220 – 233.

8. Огородникова, С.Ю. Реакции растений на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновою кислоту [Текст] / Огородникова С.Ю., Головкин Т.К., Ашихмина Т.Я. Сыктывкар: 2004. – 24 с.
9. Ашихмина, Т.Я. Мелилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических системах: действие на микроорганизмы, ферментативную активность и высшие растения [Текст] / Т.Я. Ашихмина, Л.В. Кондакова, Л.И. Домрачева, С.Ю. Огородникова // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – №2. – С. 78 – 85.
10. Лукаткин, А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс [Текст] / А.С. Лукаткин. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.
11. Муравьева, Д.А. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего [Текст] / Д.А. Муравьева, В.Н. Бубенчикова, В.В. Беликов // Фармация. – 1987. – №5. – С. 28–29.
12. Чупахина, Г. Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект): монография [Текст] / Г.Н. Чупахина, П. В. Масленников, Скрыпник Л. Н. –Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. – 111 с.

УДК 579.64:633.111:577.175.1.[48+557]

КОЛОНИЗАЦИЯ КОРНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ ПШЕНИЦЫ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS* IB-21 и IB-22

Кузьмина Л.Ю., Архипова Т.Н.

Институт биологии Уфимский научный центр РАН, г.Уфа, Россия

С целью создания альтернативы химическим препаратам для сельского хозяйства, в странах с развитым аграрным сектором производится интенсивный поиск бактерий, способных служить агентами защиты растений от болезней, продуцентами фитогормонов, способностью к фосфатмобилизации. В настоящее время разработаны и/или допущены к применению в сельском хозяйстве некоторые биопрепараты, созданные на основе бацилл-антагонистов (Алирин Б, Бактофит, Бациспектин БМ, Фитоспорин). Однако широкому их применению препятствуют слабопредсказуемая эффективность и недостаточная воспроизводимость результатов в полевых условиях. Эффективность бактериальных препаратов, предназначенных для подавления почвенных инфекций, во многом зависит от способности бактерий приживаться и развиваться в ризосфере растений и поддерживать достаточно высокую плотность популяции на протяжении всего периода вегетации.

В настоящей работе была поставлена задача, исследовать приживаемость бацилл, обладающих различной специфичностью по продукции цитокининов в корневой системе проростков пшеницы.

Объекты и методы исследований. Объектом исследований служили штаммы бацилл из коллекции Института биологии УНЦ РАН: *Bacillus subtilis* IB-22 – обладающий

способностью к продукции цитокининов [5] и мобилизацией фосфора из органических соединений и *B. subtilis* IB-21 - не продуцирующий фитогормонов. Эффективность инокуляции семян и численность бактерий в ризосфере и ризоплане изучали на проростках пшеницы (*Triticum durum* L.) сорта Безенчукская 139. Изучение колонизации бациллами прикорневой зоны пшеницы проводили в вегетационных опытах при разных методах внесения бактерий.

Семена пшеницы не стерилизовали для сохранения аборигенной микрофлоры семян. Песок для выращивания растений прокаливанием. Растения выращивали в сосудах объемом 500 см³. В каждый сосуд помещали по 10 семян. Влажность поддерживали весовым методом регулярным поливом стерильной водопроводной водой. Растения выращивали на светоплощадке с 14 ч режимом освещения при 90 Вт/м².

Препараты бактерий культивировали в колбах на ротационных качалках ($n=120$ об/мин⁻¹) при 37 °С в течение 72 - 96 ч на среде K1G, содержащей (г/л): крахмал – 10.0; дрожжевой экстракт – 5.0; пептон – 4.0; кукурузный экстракт – 1.0; NaH₂PO₄ * 2H₂O – 1.0; K₂HPO₄ * 3H₂O – 1.0; дистиллированная вода – 1 л; рН в среде – 7.6 - 7.8.

При инокуляции бактерий в корневую систему растений использовали 72 ч культуры. Препарат вносили в виде культуральной жидкости с титром клеток 10⁹ КОЕ/мл. Сухие препараты получали высушиванием культуральной жидкости (96 ч) на лиофильной сушилке. Инокуляцию зёрен препаратом бактерий производили в колбах в присутствии прилипателя Na-карбокси-метилцеллюлозы (0,01%). При использовании препаративной формы в виде рабочего раствора - «культуральной жидкости» способом полива применяли дозу - 1 мл на растение. Эта доза и форма внесения препарата на основе штамма *B. subtilis* IB-22 была эффективно апробирована в лабораторных микровегетационных опытах на растениях пшеницы и салата [1, 4]. При использовании сухих препаратов бактерий их применяли в дозе 0,2 кг/т семян.

Корневую систему трех - суточных растений для варианта обработки культуральной жидкостью анализировали через два часа и на четвертые сутки после обработки. При инокуляции бактерий на семенах численность бактерий определяли на семени и на шестые сутки выращивания растений.

Корни с прилипшим грунтом, стерильно отделяли от растений, помещали в ступку и увлажняли 100 мл водопроводной стерильной воды. Затем отмытые корни извлекали крючком, а смытый песок - ризосферный грунт и воду переносили в колбы. Для микробиологического анализа поверхности корней (ризопланы) их вносили стерильно в ступку с кварцевым песком и легко растирали, а затем помещали в колбы со 100 мл водопроводной воды. Колбы с грунтом или корнями встряхивали в качалках в течение 20 мин.

Численность интродуцированных и аборигенных бактерий определяли методом разведений и посевом на картофельный агар. Через 3 суток инкубирования в термостате при 37 °С подсчитывали количество выросших колоний и пересчитывали на численность колониеобразующих единиц (КОЕ) в расчете на 1 зерно, 1 г массы сухих корней или грунт.

Результаты исследований и их обсуждение. В таблице представлены данные по колонизации интродуцируемыми бактериями прикорневой зоны (ризосферы) и корневой системы (ризопланы) при разных дозах и способах внесения бактериальных клеток в корневую систему пшеницы. Как следует из представленных данных (табл.) во всех вариантах интродукции бактерий и без обработок наблюдалась высокая численность аборигенных и интродуцированных бактерий в ризоплане по сравнению с ризосферой. В вариантах обработок растений культуральной жидкостью бактерий числен-

Всероссийская конференция «Биотехнология – от науки к практике»
**СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
 УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ**

ность интродуцированных бактерий в ризоплане была в 4-56 раз больше чем в ризосферном грунте, а для аборигенных бактерий это соотношение составляло 10-36 раз.

Таблица 1.

Численность аборигенных и интродуцированных бактерий на поверхности корня (ризоплане) пшеницы и в ризосферном грунте при инокуляции препаратов *B. subtilis* на семя или в прикорневую зону.

Форма препарата	Время, часов	КОЕ/	10 ⁶ КОЕ/семя (г сухих корней или грунт)					
			Контроль	<i>B. subtilis</i> IB-21		<i>B. subtilis</i> IB-22		
			аборигенные	интродуцированные	аборигенные	интродуцированные	аборигенные	
Культуральная жидкость	0 ^А	растение	нд	2891.58 ± 125.63	нд	1718.76 ± 371.61	нд	
		г грунта	нд	48.18 ± 15.14	нд	28.65 ± 11.39	нд	
	2	г грунта + корней	4.43 ± 2.58	32.04 ± 12.51	9.99 ± 4.79	50.99 ± 22.19	0.001 ± 0.0005	
		96	г грунта	7.85 ± 3.02	34.83 ± 10.92	19.37 ± 7.19	43.92 ± 17.92	17.49 ± 6.99
			г корней	197.46 ± 78.19	1947.27 ± 398.49	185.86 ± 97.39	161.32 ± 56.38	635.84 ± 225.38
Сухой препарат	0	семя	0.001 ± 0.0005	0.61 ± 0.07	0.001 ± 0.0005	1.33 ± 0.14	0.001 ± 0.0005	
		144	г грунта	7.75 ± 0.98	0.01 ± 0.007	1.01 ± 0.29	0.12 ± 0.07	5.28 ± 1.14
			г корней	271.45 ± 127.59	1.75 ± 0.08	172.61 ± 87.71	7.04 ± 2.15	243.76 ± 78.73

^А – величина численности бактерий расчетная по количеству внесенного препарата бацилл; нд – нет данных.

В случае обработки растений сухими препаратами бацилл численность интродуцированных и аборигенных бактерий в ризоплане была в 40-170 раз больше чем в ризосферном грунте.

При внесении препаратов бацилл методом полива культуральной жидкостью через два часа численность аборигенных бактерий на корнях во всех вариантах обработок была того же порядка, что и в контроле (табл. 1). Однако, на четвертые сутки после внесения бацилл численность аборигенных бактерий в грунте около корней возрастала на порядок. Увеличению численности аборигенных бактерий на корнях растений способствует внесение микробных метаболитов, содержащихся в культуральной жидкости.

На четвертые сутки после полива растений культуральной жидкостью численность бацилл в ризосфере (грунте), примыкающей к корням, оставалась неизменной. В тоже время в ризоплане количество интродуцированных бацилл возрастало в десятки и сотни раз (табл.).

При инокуляции семян сухими препаратами бацилл, через шесть суток выращивания растений, интродуцированные штаммы колонизировали ризоплану в численности 10⁶ КОЕ/г корней и обнаруживались в ризосфере 10⁴ – 10⁵ КОЕ/г грунта (табл.).

Оба исследуемых штамма штамма бацилл, в т.ч. продуцент цитокининов *B. subtilis* IB-22 и штамм, не обладающей способностью к продукции фитогормонов - *B. subtilis* IB-21, при разных дозах и способах использования препаратов, успешно колонизировали корневую систему пшеницы на ранних стадиях её развития. Следует отметить что использование штаммов даже в очень высокой дозе не вызывало угнетения растений.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-97049).

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова Т. Н., Веселов С. Ю., Кудоярова Г. Р. Влияние цитокининпродуцирующих микроорганизмов на рост растений салата при различном уровне их влагообеспеченности // *Агрохимия*. 2003. №5. С.36-41.
2. Мартыненко Е. В. Влияние цитокининпродуцирующих бактерий рода *Bacillus* Cohn на рост растений салата и пшеницы: автореф. к-та. биол. наук. Уфа, 2009. 22 с.
3. *Bacillus subtilis* ИБ-22 продуцент цитокининов / Мелентьев А. И., Кудоярова Г. Р., Веселов С. Ю., Архипова Т. Н., Гильванова Е. А., Усанов Н. Г., Кузьмина Л. Ю., Симонян М. В. Россия. Патент RU 2178970 С2, МПК А01N63/00. Заявл. 13.03.2000. Оpubл. 10.02.2002. Бюл. № 4. С. 1-10.

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ *BACILLUS SUBTILIS* НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ РАСТЕНИЙ *TRITICUM AESTIVUM* ПРИ Cd-СТРЕССЕ

Курамшина З. М.¹, Смирнова Ю. В.¹, Хайруллин Р. М.²

¹Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета,
г. Стерлитамак, Россия

²Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) – один из основных абиотических стрессов, оказывающих влияние на растения. Общим следствием токсичности ТМ, в том числе и кадмия, в растительном организме является чрезмерное накопление активных форм кислорода, которые могут вызвать перекисное окисление липидов, окисление белка, инактивацию ферментов, повреждение нуклеиновых кислот и др. Высшие растения развили сложные системы антиоксидантной защиты растительных клеток от окислительного стресса, важнейшим звеном которых являются антиоксидантные ферменты – каталаза и пероксидаза. Сохранение активности этих ферментов в условиях воздействия ТМ ряд исследователей связывают с устойчивостью растений к данному виду стресса [1].

В настоящее время, одним из перспективных направлений по повышению устойчивости растений к действию различных стрессовых факторов является использование эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*, обладающих фунгицидной и ростстимулирующей активностями [2]. Известен антистрессовый эффект *B. subtilis* (например, штаммы 26Д и 11ВМ) при воздействии на растения различных абиотических факторов (засоление, водный дефицит, действие ТМ) [2, 3, 4]. В литературе, однако, отсутствуют сведения о механизмах антистрессового эффекта этих бактерий, в том числе и при воздействии на растения ТМ. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение

влияния инокуляции семян пшеницы эндофитными штаммами бактерий *B. subtilis* шт. 11ВМ на рост и активность антиоксидантных ферментов растений пшеницы при Cd-стрессе.

Объектом исследования служили растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., Омская-35). Эксперименты проводили в лабораторных условиях, в водной культуре. Семена перед посадкой промывали в мыльной воде, стерилизовали этанолом, ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали. В экспериментах использовали бактерии *B. subtilis* шт. 11ВМ (выделены в лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ из поверхностно стерилизованных тканей растений мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L.). Обработку семян бактериями проводили в стерильных условиях, в ламинар-боксе. В опытах использовали 20-часовую культуру бактерий, растущую на мясопептонном агаре. 1 г семян обрабатывался 20 мкл суспензии бактерий концентрации 10^6 кл/мл. Обработанные семена выдерживали в течение часа, затем использовали в экспериментах. Контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой. Обработанные бактериями и контрольные семена проращивали в чашках Петри в дистиллированной воде. Наклюнувшиеся семена раскладывали в вегетационные сосуды по 30 семян. Для эксперимента использовали стеклянные сосуды емкостью 750 мл, $d=120$ мм. Кадмий в виде соли $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ добавляли в концентрациях 0.05, 0.1, 0.5 мг/л. Сосуд с дистиллированной водой без металла использовали в качестве контроля.

Растения выращивали при равномерном освещении в течение 14 дней, каждый день доливали испарившуюся дистиллированную воду до метки. На 3, 9, 14 сутки проводили измерение биомассы растений и отбор проб для определения активности пероксидазы.

Отбирали проростки растений, выращенные в растворах с различной концентрацией ионов кадмия, промывали в дистиллированной воде, удаляли избыток воды, взвешивали. Растительный материал гомогенизировали в 0.1М К-фосфатном буфере рН 6.0, центрифугировали 10 минут при 6-8 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость центрифугировали 10 минут при 16-18 тыс. об./мин. Для определения активности пероксидазы использовали надосадочную жидкость. Активность фермента оценивали согласно методике Хайруллина с соавторами, исходя из количества окисленного ортофенилендиамина [5]. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

При выращивании пшеницы в водной культуре было отмечено, что растения, инокулированные клетками *B. subtilis*, имели более высокие показатели биомассы побегов и корней, чем необработанные (табл. 1). Так, на 9 сутки показатели сырой массы обработанных *B. subtilis* 11ВМ растений были выше, чем у необработанных на 18 и 14%, для корней и побегов соответственно. Известно, что бактерии *B. subtilis* шт. 11ВМ являются эндофитами, способными стимулировать рост растений, синтезируя регуляторы роста, защищая растения от фитопатогенов, мобилизуя питательные вещества и улучшая структуру почвы [6, 7].

Содержание тяжелого металла в растворе в концентрации 0.05 мг/л оказывало слабое стимулирующее действие на рост корней на 3 и 14 сутки эксперимента (в пределах 6% по отношению к собственному контролю), заметную стимуляцию побегов наблюдали только на 14 сутки. Подобные эффекты кадмия описаны в литературе. Так, кадмий в очень низких концентрациях способен стимулировать рост растений, повышать содержание фотосинтетических пигментов, уменьшать интенсивность перекисного окисления липидов [1].

Ионы кадмия в высоких концентрациях (0.1 и 0.5 мг/л) угнетали рост необработанных растений пшеницы во все дни эксперимента. Корневая система была более

чувствительна к действию металла. Растения, инокулированные бактериями, в присутствии кадмия росли лучше необработанных. Так, при концентрации 0.5 мг/л масса побегов у обработанных бактериями *B. subtilis* 11ВМ растений была больше необработанных на 20%, масса корней – на 21%.

Таблица 1

Влияние кадмия на сырую массу растений пшеницы, мг

Концентрация Cd, (мг/л)	Вариант	Время, сутки					
		3		9		14	
		корни	побеги	корни	побеги	корни	побеги
0	Не обр.	61.7±2.4	64.9±0.1	70.0±1.4	85.0±0.1	80.0±2.3	103.3±4.7
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	65.0±0.1	67.9±0.1	83.0±0.1	97.2±0.1	91.6±4.1	106.8±7.1
0.05	Не обр.	65.8±0.1	55.8±0.1	70.0±1.2	75.0±0.1	85.0±1.0	128.0±1.3
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	54.2±0.1	62.5±0.1	67.0±0.1	85.1±1.7	88.3±4.2	115.1±4.4
0.1	Не обр.	68.3±3.9	60.8±0.1	54.1±0.1	75.0±0.1	68.3±4.2	105.0±0.9
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	67.6±0.1	70.8±0.1	67.3±0.1	87.1±0.4	80.1±2.2	113.0±2.3
0.5	Не обр.	52.5±4.5	55.8±4.8	47.1±2.3	72.0±0.2	48.3±0.9	98.3±7.7
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	58.3±4.5	59.2±3.3	57.3±0.1	72.4±1.2	58.3±3.7	118.1±0.7

В ходе эксперимента было отмечено, что активность пероксидазы в тканях необработанных растений была максимальной на третьи сутки роста в среде без металла (табл. 2). У обработанных клетками *B. subtilis* растений активность фермента была выше, чем у необработанных на 9 и 14 сутки. При добавлении ионов кадмия в раствор активность пероксидазы у обработанных и неинокулированных бактериями растений на 9 и 14 сутки роста повышалась. У обработанных бактериями растений резко активнее пероксидазы в присутствии металла на 9 и 14 сутки была выше, чем у необработанных.

Таблица 2

Активность пероксидазы в тканях пшеницы, выращенных в водной культуре при воздействии ионов кадмия, ед. мг⁻¹·с⁻¹

Концентрация Cd, (мг/л)	Вариант	Время, сутки					
		3		9		14	
		Корни	побеги	корни	побеги	корни	побеги
0	Не обр.	6.2±0.1	3.8±0.1	3.9±0.1	3.3±0.1	3.3±0.3	2.4±0.1
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	5.4±0.1	3.7±0.1	4.7±0.4	5.1±0.1	6.6±0.4	3.3±0.3
0.05	Не обр.	4.6±0.2	3.8±0.1	5.5±0.1	4.2±0.1	3.4±0.1	5.5±0.4
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	5.4±0.1	2.8±0.1	6.2±0.9	6.3±0.1	5.6±0.1	5.9±0.1
0.1	Не обр.	4.5±0.1	3.2±0.1	4.5±0.2	6.1±0.2	3.7±0.1	5.6±0.5
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	4.8±0.1	3.3±0.1	8.4±0.7	7.2±0.1	4.7±0.4	5.0±0.1
0.5	Не обр.	5.2±0.1	3.5±0.1	6.5±0.1	6.3±0.6	8.4±0.1	3.6±0.3
	Об. <i>B.s.</i> 11ВМ	4.4±0.1	2.6±0.1	7.3±0.1	7.5±0.2	7.7±0.1	4.9±0.2

Известно, что в токсичных концентрациях ионы ТМ индуцируют образование АФК и могут вызывать значительные отклонения метаболизма [1]. У растениях пшеницы окислительный стресс, вызванный кадмием, выражался в повышении активности пероксидазы. Инокуляция клетками *B. subtilis* снижала токсический эффект кадмия, что проявлялось не только в показателях лучшего роста при воздействии ионов кадмия, но и в более высоких показателях активности пероксидазы. Таким образом, повышение устойчивости растений, обработанных бактериями *B. subtilis* шт. 11ВМ, при воздействии ионов кадмия можно объяснить повышением активности антиокислительных ферментов и менее интенсивным развитием окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.
2. Хайруллин Р. М., Недорезков В. Д., Мубинов И. Г., Захарова Р. Ш. Повышение устойчивости пшеницы к абиотическим стрессам эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* // Вестник ОГУ. 2007. № 2. С. 129 – 134.
3. Курамшина З. М., Смирнова Ю. В., Хайруллин Р. М. Повышение толерантности проростков подсолнечника *Helianthus annuus*, инокулированных эндофитным штаммом *Bacillus subtilis*, к действию тяжелых металлов. Сообщение 2. Антистрессовая активность эндофита *Bacillus subtilis* 26D при действии тяжелых металлов на растения подсолнечника *Helianthus annuus* // IV Всероссийская научно-практическая конференция «Проблемы экологии Южного Урала»: приложение к 10 номеру (2009 г.) журнала «Вестник ОГУ», 20-21 октября 2009 г. – Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2009. С. 461 – 463.
4. Егоршина А. А., Р. М. Хайруллин, Лукьянцев М. А., Курамшина З. М., Смирнова Ю. В. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы / Научный журнал Сибирского федерального университета. Красноярск. 2011. № 1. С.172 – 182.
5. Хайруллин Р. М., Яруллина Л. Г., Трошина Н. Б., Ахметова И. Э. Активация хитоолигосахаридами окисления ортофенилендиамина проростками пшеницы в присутствии щавелевой кислоты // Биохимия. 2001. Т. 66. № 3. С. 354 – 358.
6. Архипова Т. Н., Веселов С. Ю., Мелентьев А. И., Мартыненко Е. В., Кудоярова Г. Р. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 4. С. 567 – 574.
7. Мелентьев А. И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Сohc в агроэкосистемах. М.: Наука. 2007. – 147 с.

УДК 582.688.3:602.6

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO МАЛОРАСПРОСТРАНЕННЫХ ПЛОДОВО - ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

Малаева Е.В.¹, Молканова О.И.², Коновалова Л.Н.²

¹ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад», г. Волгоград, Россия

²ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, г. Москва, Россия

В настоящее время особую актуальность имеют исследования по разработке методов сохранения и размножения уникальных форм, сортов и генотипов растений, расширяющих и улучшающих сортимент возделываемых культур. К таким растениям по праву относятся малораспространенные плодово-ягодные культуры: *Lonicera* L. (жимолость), *Actinidia* Lindl. (актинидия), *Rubus* L. (малина ремонтантные сорта).

Одной из особенностей многих перспективных сортов актинидии, жимолости и ремонтантных сортов малины является их невысокая способность к воспроизводству при традиционных способах размножения. Применение методов биотехнологии оправдано и экономически эффективно, особенно в отношении ягодных культур [1, 3]. Использование методов размножения *in vitro* является оптимальным решением задачи как для размножения растений с нарушенным процессом воспроизводства, так и для массового размножения ценных генотипов растений [2, 3]. Еще одна проблема, которая может быть преодолена с помощью микроклонального размножения — это оздоровление растений от вирусных, грибных и бактериальных заболеваний.

Все это определяет актуальность проведения работ и исследований по разработке и усовершенствованию методик клонального микроразмножения малораспространенных плодово-ягодных культур. Генетический банк плодово-ягодных культур Волгоградского регионального ботанического сада и Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН включает представителей следующих семейств: *Grossulariaceae* DC. (*Grossularia* Mill., *Ribes* L.) *Caprifoliaceae* Juss. (*Viburnum* L., *Lonicera* L.), *Rosaceae* Adans. (*Rubus* L., *Cerasus* Mill., *Armeniaca* Mill., *Sorbus* L., *Prunus* L.), *Actinidiaceae* Van-Tieghem (под *Actinidia* Lindl.).

Методика исследований основывалась на общепринятых классических приемах с культурами изолированных тканей и органов растений [2]. В качестве первичных эксплантов использовали апикальные и латеральные почки в фазе активного роста, размером 0,5–1,5 мм.

В настоящее время разработаны и используются различные схемы стерилизации в зависимости от специфики культуры и типа экспланта. Для получения стерильной культуры плодовых растений, в частности актинидии, малины, жимолости использовали Лизоформин 3000 в концентрации 5%, время экспозиции 3 минуты.

При его использовании выход жизнеспособных эксплантов был максимальным и составлял около 90 % (рис.1).

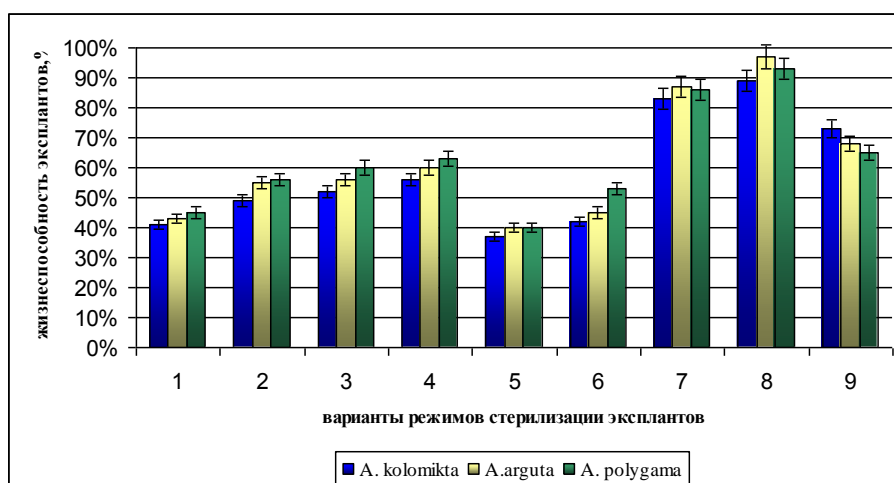


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности эксплантов актинидии от режима стерилизации. Условные обозначения: 1. белизна 35%, 5 мин. 2. белизна 35%, 10 мин. 3. белизна 50%, 3 мин 4. белизна 50%, 5 мин. 5. хлорамин 5%, 5 мин. 6. хлорамин 5%, 10 мин. 7. лизоформин 5%, 1 мин. 8. лизоформин 5%, 3 мин. 9. лизоформин 5%, 5 мин.

Для получения и поддержания активно пролиферирующей культуры *in vitro* важным является правильный выбор цитокинина. На этапе введения и микроразмножения использовали следующие регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (6-БАП), 6-бензиламинопурин рибозид (6-БАПр), зеатин (Z), кинетин – 6-фурфуриламинопурин, кинетин рибозид (Кр), 2-изопентиниладенин (2-иР), тидиазурон (TDZ).

При клональном микроразмножении жимолости оптимальным цитокином является 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л, при этом коэффициент размножения составил $35 \pm 0,9$ шт. Использование цитокининов в сочетании с ауксинами является вполне обоснованным для этой культуры. Наибольший коэффициент размножения наблюдали на среде 6-БАП 1,0+ИМК 0,5 - $74,0 \pm 1,1$ шт.

Изучение влияния типа и концентрации цитокининов для представителей рода *Actinidia* выявило, что все исследованные фитогормоны, за исключением кинетина, в целом обеспечивали увеличение коэффициента размножения данной культуры (рис. 2).

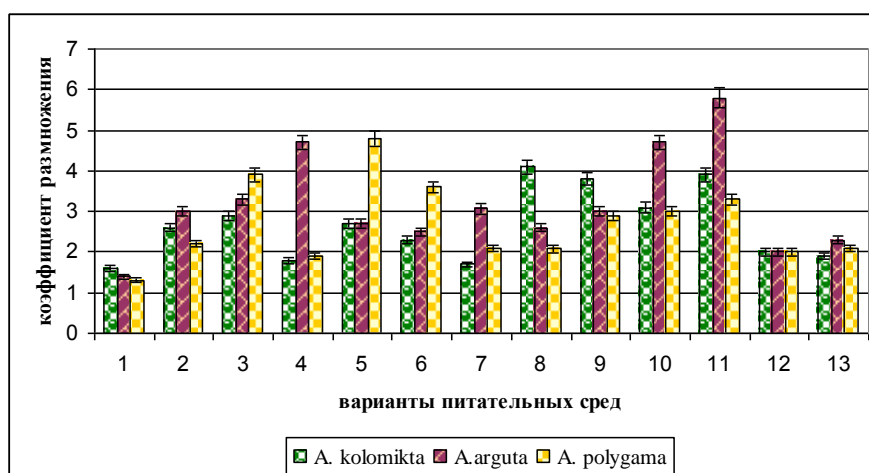


Рис.2. Влияние типа и концентрации цитокинина на коэффициент размножения некоторых представителей рода *Actinidia*.

Условные обозначения: 1. контроль, без гормонов. 2. Z 3,0 мг/л. 3. Z 5,0 мг/л. 4. Zp5,0 мг/л. 5. 6-БАП 0,5 мг/л. 6. 6-БАП 1,0 мг/л. 7. 6-БАПр 1,0мг/л. 8. TDZ 0,02 мг/л. 9. TDZ 0,05 мг/л. 10. 2iP 3,0 мг/л. 11. 2iP 5,0 мг/л. 12. К 0,5 мг/л. 13. К 1,0 мг/л.

Под воздействием 2 iP коэффициент размножения *A. kolomikta* и *A. arguta* существенно превышал значение этого показателя на средах с 6-БАП.

Для *A. polygata* отмечено максимальное значение коэффициента размножения на средах, содержащих 6-БАП (0,5 мг/л) или Z (5,0 мг/л).

Содержание в среде зеатина увеличивало коэффициент размножения у всех исследуемых образцов актинидии, одновременно стимулируя образование каллуса, что в последствии незначительно затрудняло адаптацию растений - регенерантов *in vivo*.

Для представителей рода *Rubus* положительный эффект дает использование гибберелловой кислоты в концентрации 0,2-0,5 мг/л. Актинидия и жимолость не нуждаются в использовании экзогенной ГК. У жимолости гибберелловая кислота приводит к формированию конгломератов тонких побегов или побегов с видоизмененной морфологией, которые непригодны для укоренения.

Для получения побегов оптимальных для укоренения 1,5-2 см некоторые авторы рекомендуют снижать концентрацию 6-БАП в пассаже, предшествующем укоренению, до 0,01- 0,25 мг/л [3,5]. По нашим данным, использование питательных сред без гормонов или питательной среды MS с половинным содержанием макросолей для актинидии и жимолости образуется достаточное количество побегов пригодных для укоренения и нет необходимости в промежуточной фазе.

Кроме того, в процессе культивирования на стадии пролиферации у побегов разных видов актинидии наблюдали спонтанное укоренение.

Однако для разработки промышленной технологии клонального микроразмножения видов и сортов актинидии данные показатели являются недостаточными и требуется этап укоренения.

Для укоренения актинидии в культуре *in vitro* лучшие показатели наблюдали с ИУК по сравнению с ИМК. При этом оптимальной оказалась концентрация 1,0 мг/л. Выход адаптированных растений составил 70 – 95%. При укоренении малины ремонтантного типа оптимальная концентрация ИУК в среде составила 5,0 мг/л.

Максимальные показатели количества корней и длины корней жимолости зафиксировали при использовании в качестве ауксина ИУК, что соответствует данным полученным другими исследователями [4]. Однако, наибольший процент укоренения (90%) наблюдается на средах с ИМК. При этом оптимальной оказалась концентрация ИМК 1,0 мг/л. Отмечено, что на данной питательной среде происходит лучшее развитие корневой системы у жимолости, особенно корней второго порядка (рис. 3).

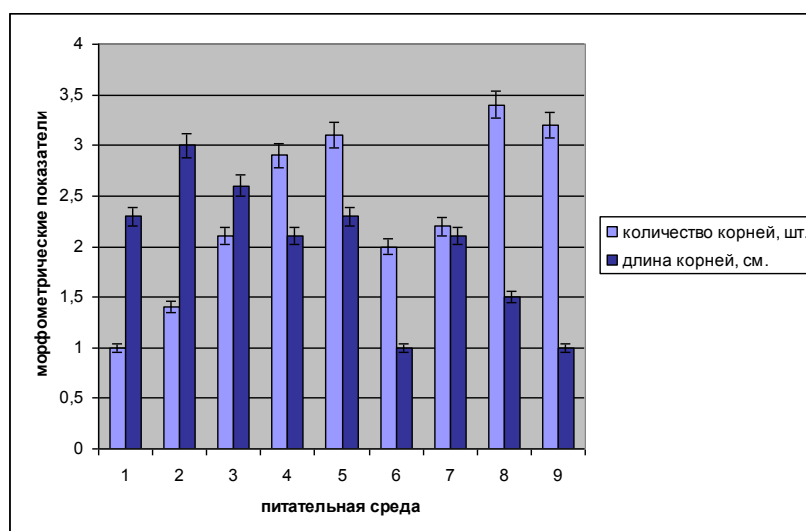


Рис. 3. Влияние ауксинов на морфометрические показатели микропобегов жимолости. 1- Б/Г; 2- ИУК 0,5 мг/л; 3- ИМК 0,5 мг/л; 4- ИУК 1,0 мг/л; 5- ИМК 1,0 мг/л; 6- ИУК 1,5 мг/л; 7- ИМК 1,5 мг/л; 8- ИУК 2,0 мг/л; 9- ИМК 2,0 мг/л.

Для лучшей адаптации растений к условиям *in vivo* в первые две недели необходимо поддерживать относительную влажность 75-80%. Это можно обеспечить, создав условия «влажной камеры» с ежедневным кратковременным проветриванием. Температура должна быть не ниже 20°C и не выше 25°C, т. к. при снижении температуры наблюдается замедление темпов роста. Необходимо обеспечивать повышенную освещенность растений.

Через 2-3 месяца после адаптации растения можно переносить в открытый грунт.

По нашим данным, использование двухстадийной адаптации дает положительный эффект для плодово-ягодных культур. В качестве субстрата использовали смесь торфа, песка и почвы в соотношении 1:1:1. Выход адаптированных растений в среднем составил 70 – 95%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барыкина Р. П. Некоторые закономерности морфогенеза при вегетативном размножении растений в природе и при регенерации *in vitro* // Проблемы ботаники на рубеже XX-XXI веков: Тезисы докладов представленных II(X) съезду Русского ботанического общества. - СПб.: Ботанический институт РАН, 1998. Т.1. С. 8.
2. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
3. Высоцкий В. А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Высоцкий В. А. М., 1998. 44 с.
4. Куклина А.Г., Семерикова Е. А., Молканова О.И. Опыт клонального микроразмножения голубых жимолостей // Бюл. Гл. ботан. сада. Вып. 185. 2003. С. 160-167.
5. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro* (методические рекомендации / Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Мичуринск-научоград, 2008. 69 с.

УДК 595.768.12:635.21

ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ *Bacillus subtilis* 26Д СНИЖАЮТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА НА РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПУТЕМ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МИКРОФЛОРУ ЕГО ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Максимов И.В., Нафикова А.Р., Сорокань А.В., Благова Д.К., Беньковская Г.В.

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра
Российской академии наук, г. Уфа, Россия

В последнее время в растениеводство активно внедряются технологии «органического земледелия», исключаящие из процесса получения сельскохозяйственной продукции различные химические средства защиты растений, которые нарушают экологический баланс окружающей среды. Понятно, что в условиях выращивания продукции в виде монокультуры трудно обойтись без использования неких кардинальных средств защиты растений от патогенов и насекомых; в этих условиях биопрепараты, содержащие эндофитные бактерии могут быть эффективны в качестве профилактических мер против заболеваний. Особо привлекательными среди них для промышленного (коммерческого) производства являются штаммы бактерий из рода *Bacillus* [Мелентьев, 2007]. На основе одного из штаммов *B. subtilis* 26Д создан препарат Фитоспорин, эффективный против плесневения и гнилей семян различных культур, черной ножки, фитофтороза, альтернариоза картофеля и способный непосредственно воздействовать на ростовые характеристики патогенов. Защитная активность бактерии *B. subtilis* FZB-24 на растениях спаржи и картофеля была высокой по отношению к патогенам *F. oxysporium* Schlecht, *Streptomicesscabies*, *Erwiniacarotovorassp. atroseptica* [Kilanetal., 2000]. Препарат Бациспецин БМ на основе *B. subtilis* 739 ингибировал развитие корневых гнилей, аэрогенных инфекций (желтая, бурая и стеблевая ржавчины) на посевах пшеницы, где его эффективность действия не уступала химическим пестицидам [Мелентьев и др., 2006]. Имеются сообщения о способности некоторых штаммов *Bacillus* контролировать развитие головневых, например *Tilletiacariesi* *T. levis* на злаках [Kollmorgen, Jones, 1975]. Отдельно следует заметить, что некоторые представители из рода *Bacillus*, например *B. cereus* AR156 (Wei et al., 2010), *B. thuringiensis* (Dipel® biopreparation), *B. megaterium* и *B. subtilis* (Khalil, 2013) эффективны против галловой нематоды томатов *Meloidogyne incognita*. Обнаружено, что свойство сдерживать развитие вируса мозаики огурца на растениях томата изолятом *B. subtilis* BS3A25 опосредовано способностью этого штамма угнетать развитие переносчика этого заболевания – бахчевой тли *Aphis gossypii* [Shudhakaret al., 2011].

Поскольку на картофеле сильный ущерб наносит колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* (Say), интерес представляют данные о способности основы этого биопрепарата – штамма *B. subtilis* 26Д- воздействовать на него.

Материалы и методы

Пробирочные стерильные растения сорта Ранняя Роза после 20 суток культивирования на среде Муросиге-Скуга обрабатывали бактериальной суспензией штамма *B. Subtilis* 26Д. Затем, еще через 20 сут в растениях после жесткой поверхностной стерилизации было проанализировано наличие бактерий во внутренних тканях (рис. 1). Па-

параллельно часть опытных растений скармливали имаго и личинкам колорадского жука и оценивали их выживаемость. По мере прохождения эксперимента часть особей колорадского жука использовалась для выделения и идентификации микроорганизмов из содержимого передней и задней части кишечника. Идентификацию родовой принадлежности эндосимбионтов проводили после секвенирования фрагмента гена 16SPHK и его анализа с использованием компьютерных программ и международной базы данных GenBank. Работы по определению антагонизма штамма *B. subtilis* 26Д к выделенным изолятам бактерий проводили после нанесения бактерий на поверхность питательной среды поперечными штрихами.

Результаты и обсуждение

Как видно, из рис. 1. штамм бактерии *B. subtilis* 26Д характеризуется свойством колонизировать ткани растений.

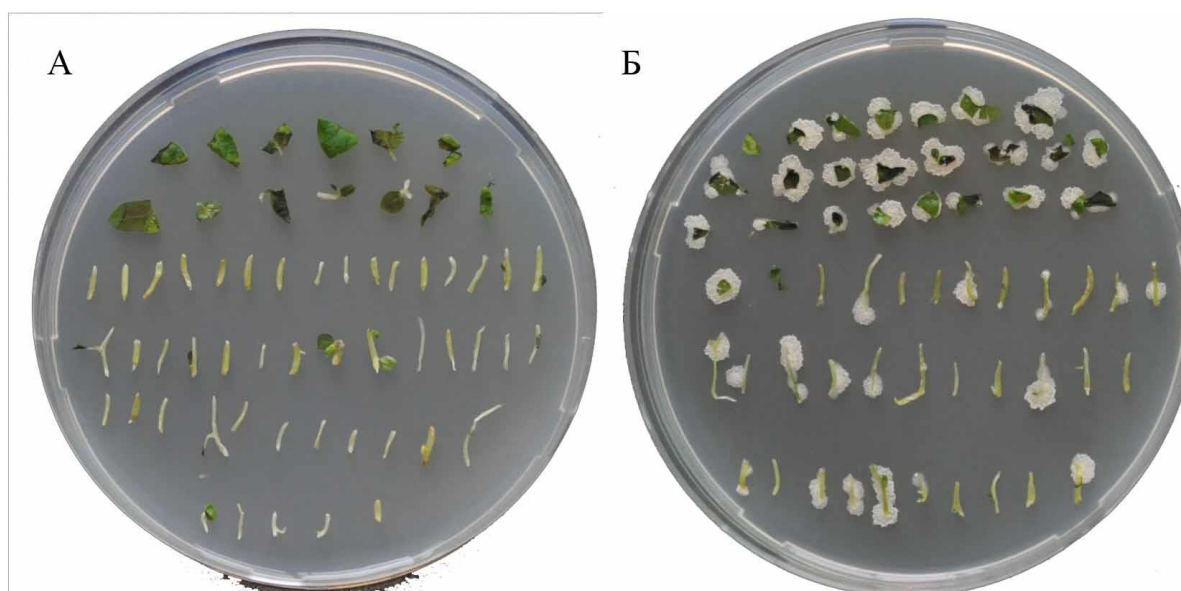


Рис. 1. Доказательство возможности эндофитного существования бактерий *B. subtilis* 26Д в тканях пробирочных растений картофеля сорта Ранняя роза. А) отрезки тканей из разных органов контрольных растений, Б) отрезки тканей из растений обработанных бактериальной культурой. (20 суток совместного культивирования) (48 ч. культивирования на среде КГА при 25°C).

Таблица.
 Выживаемость особей колорадского жука после кормления обработанными бактерией *B. subtilis* 26Д растениями картофеля сорта Ранняя Роза (7 сут после кормления).

Вариант	Личинки III возраста, %	Перезимовавшие имаго, %
Контроль	55	75
Бактерии <i>B. subtilis</i> 26Д	10	20

В таблице 1 представлены данные по выживаемости взрослых имаго и личинок колорадского жука в опытных вариантах. Как видно, под влиянием *B. subtilis* 26Д резко

снижается степень выживаемости как личинок, так и имаго колорадского жука. Следует заметить, что если в контроле происходила естественная последующая убыль численности насекомых (не более 10%), то в варианте после обработки *B. subtilis* 26Д личинки полностью вымирали к 10 сут, а имаго полностью погибали к 20 сут.

Предварительный анализ микрофлоры из различных органов пищеварительного тракта показал, что из передней части кишечника взрослого жука идентифицированы штаммы бактерий, преимущественно относящиеся к роду *Enterobacter*, в то же время из задней части кишечника этого жука выделялись бактерии из рода *Acinetobacter*. Как показано, являются компонентами естественной микрофлоры пищеварительного тракта насекомых [Muratoglu et al., 2011].

На рис. 2 представлены данные о влиянии штамма бактерии *B. subtilis* 26Д на рост колоний эндосимбионтов *Enterobacter* spp. и *Acinetobacter* spp. из соответствующих органов колорадского жука. Как видно, штамм бактерии *B. subtilis* 26Д ингибировал рост обоих симбионтов. При этом ингибирование роста *Enterobacter* spp. было более заметным, чем *Acinetobacter* spp..



Рис 2. Анализ антагонистической активности бактерии *B. subtilis* 26Д (вертикальный штрих) на рост колоний эндосимбионтов *Enterobacter* spp. (1-3) и *Acinetobacter* spp. (4-6)

Итак, полученные нами в этом опыте данные, с одной стороны, подтверждают ранее известные результаты по способности штамма бактерии *B. subtilis* 26Д колонизировать ткани растений картофеля [Абизгильдина, 2012]. С другой – говорят о том, что эта бактерия может подавлять рост и развитие эндосимбионтов *Enterobacter* spp. и *Acinetobacter* spp., выделенных из органов пищеварительной системы имаго и личинок колорадского жука. Не исключено, что способность бактерий антагонистически взаимодействовать с эндосимбионтами жука является одним из важных условий последующего снижения степени выживаемости опытных насекомых.

Работа выполнена при поддержке ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации (госконтракт 14.BVV.21.0063).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абизгильдина Р.Р. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05. – Физиология и биохимия растений на тему «Индукция защитной системы пшеницы и картофеля эндодитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д» Уфа – 2012.
2. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn. в агроэкосистемах. М.: Наука. 2007. 147 с.
3. Мелентьева А.И., Кузьмина Л.Ю., Яковлева О.В., Курченко В.П. Штамм *Bacillus subtilis* – продуцент сурфактина / Пат. 2270858. РФ. // Б.И. 2006. №6.
4. Khalil, M. The potential of five eco-biopreparational products on the reproduction of root-knot nematode and plant growth. // *Esci Journal of plant Pathology*. 2013. V. 2. P. 84-91.
5. Kilan M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmeiedeknecht G., Hain R. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of microbial agent enhancing plant vitality // *Planzenschutz-Nachrichten Bayer*. 2000. V. 1. P. 72-93.
6. Kollmorgen, J.F. and Jones, L.C. (1975) The effect of soil borne microorganisms on the germination of chlamidospores of *Tilletia caries* and *T. fortida*. *Soil Biology & Biochemistry*. 7, 407–410.
7. Muratoglu H., Demirbag Z., Sezen K. The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // *Biologia*. 2011. V. 66/2. P. 288—293,
8. Sudhakar N., Thajuddin N., Murugesan K. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection of tomato in the field against cucumber mosaic virus and its vector *Aphis gossypii* // *Biocontrol Science and technology*. 2011. V. 21. P. 367-386.

УДК 581.192:635.295

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНАТА НАТРИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СЕМЯН, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ *ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.

Матистов Н.В., Ширшова Т.И., Бешлей И.В.

ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

Исследования последних лет показали, что одной из причин высокой смертности в нашей стране и во всем мире от онкологических заболеваний, заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной и иммунной системы может быть недостаточность селена (Se). В последнее десятилетие резко возросло внимание исследователей к растениям рода *Allium*, способным аккумулировать MeSeCys и γ -Glu-MeSeCys, обладающих выраженным антиканцерогенным действием [Ширшова и др., 2011]. Повышение содержания селена (например, MeSeCys в чесноке) в настоящее время осуществляют или внесением Se в почву, или вымачиванием луковиц в растворе селената натрия. Микроэлементный состав культурных растений разнообразен и обусловлен биологическими особенностями самих растений, а также большой вариабельностью содержания по-

движных форм элементов в почвах [Власюк, 1974; Ринькис, 1979]. Важным вопросом остается влияние удобрений на изменение физиологических процессов, протекающих в растении [Битюцкий, 2011].

Целью нашего исследования была оценка влияния селената натрия на жизнеспособность семян, химический состав и начальные этапы развития *Allium schoenoprasum* L. при использовании для намачивания растворов различных концентраций.

Для исследования брали семена *A. schoenoprasum*, выращенного в Ботаническом саду Института Биологии Коми НЦ УрО РАН. Сбор производили в сентябре 2011 г. Семена сушили в термостате при 35 °С и постоянном вентилировании, намачивали в 0,001 и 0,005 % растворах селената натрия, лабораторную всхожесть семян определяли по методике Николаевой с соавторами (1999). Проращивали в полиэтиленовых ящиках, заполненных торфяно-песчаной смесью. Высаженные растения подкармливали из расчета 0,5 и 1,5 мг селената натрия (Na_2SeO_4) на 1 кг почвы. Промеры растений проводили после 4 месяцев посадки семян в грунт.

Для проведения эксперимента брали по 500 семян, для каждой из семи групп. Первая группа, семена которой не подвергались обработке селенатом натрия, использовали в качестве контроля (табл. 1).

Таблица 1

Методы обогащения семян и проростков *A. schoenoprasum* растворами селената натрия

Номер образца	Намачивание семян в 0,001 % р-ре Na_2SeO_4	Намачивание семян в 0,005 % р-ре Na_2SeO_4	Однократная подкормка растений 1,5 мг Na_2SeO_4 /кг почвы	Трехкратная подкормка растений 0,5 мг Na_2SeO_4 /кг почвы
1	–	–	–	–
2	–	–	х	–
3	–	–	–	х
4	–	х	–	–
5	–	х	х	–
6	х	–	–	–
7	х	–	х	–

Наблюдение за жизнеспособностью и всхожестью семян проводили в течение 21 дня.

Максимальная энергия роста (жизнеспособность) семян наблюдалась на третьей сутки эксперимента: для обр. 1-3 (контроль, вода) составила 31-40 %, намоченных в 0,005 % растворе Na_2SeO_4 (обр. 4-5) – 44-42 %, в 0,001 % растворе Na_2SeO_4 (обр. 6-7) – 52-55 %. Намачивание семян в растворе селената натрия значительно повышало их жизнеспособность: максимальная жизнеспособность (87-89 %) наблюдалось для обр. 6, 7 (намачивание в 0,001 % Na_2SeO_4), для обр. 4, 5 (0,005 %) – 77-78 %. Самая низкая жизнеспособность (69-72 %) была для семян контрольной группы (обр. 1-3).

По результатам промеров растений *A. schoenoprasum* на начальных этапах развития были выявлены значительные отличия в морфологии луковиц (табл. 2). Обр. 1 (контроль) имел округлые сферические луковицы длиной 1 см, а образцы, прошедшие намачивание и подкормку растворами селената натрия, имели вытянутые луковицы, максимальная длина которых составила 5,3 см (обр. 5), получивший максимальные дозы селената натрия.

Отличий в морфологии луковиц растений *A. schoenoprasum*, семена которых прошли намачивание в растворах Na_2SeO_4 (обр 4, 6), не обнаружено; длина их составила 3,2-3,3 см.

Для растений, полученных из семян, не подвергавшихся намачиванию в растворе Na_2SeO_4 , наибольшее влияние на морфологию луковиц оказала трехкратная подкормка Na_2SeO_4 (обр. 3). При однократной подкормке тем же количеством (обр. 2) изменения этих частей растений были меньше. Максимальная длина корней обнаружена у обр. 1 (контроль), минимальная - для обр. 5 (5,0 см) и обр. 7 (4,8 см), для которых было проведено намачивание в растворах селена и последующая однократная подкормка 1,5 мг/1 кг почвы. Повышение содержания селена намачиванием семян в растворах селената натрия, а также внесение его в почву оказывало влияние на морфологию развивающегося растения – приводило к уменьшению длины коней, увеличению длины луковиц в зависимости от количества селената натрия. На длину листьев селенат натрия влияния не оказывал (табл. 2).

Таблица 2

Влияние селената натрия на морфологические показатели (длину) различных частей растения *A. schoenoprasum*, см

Номер образца	корни	S(x)	луковица	S(x)	лист, см	S(x)
1	7,5	1,5	1,0	0,3	15	3
2	6,1	0,9	3,0	0,5	15	5
3	5,9	1,3	3,5	0,6	16	5
4	7,2	1,3	3,2	0,4	15	3
5	5,0	1,0	5,3	0,7	16	4
6	5,6	1,0	3,3	0,4	14,4	1,8
7	4,8	0,7	3,1	0,2	12,1	1,6

S(x) – стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности

Полученные данные обработаны статистически с помощью пакета компьютерных программ *Statistica for Windows*

По результатам химического состава селенобогатых растений наблюдается снижение в содержании микроэлементов (Pb, Ni, Co, Fe, Al, Mg, Cr), а также изменения в ассимиляции общего азота и протеиногенных аминокислот.

Выводы

1. Намачивание семян *A. schoenoprasum* в растворах селената натрия способствует увеличению энергии роста.
2. Внесение в почву селената натрия оказывало влияние на морфологию только подземных частей (корни, луковицы) развивающегося растения.
3. Для селенобогатых растений наблюдается снижение в содержании микроэлементов (Pb, Ni, Co, Fe, Al, Mg, Cr), а также изменения в ассимиляции общего азота и протеиногенных аминокислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного гранта УрО РАН № 12-И-4-2072.

ЛИТЕРАТУРА

1. Битюцкий Н.П. Микроэлементы высших растений. Спб.: изд Санкт-Петербургского ун-та. 2011. – 368 с.
2. Власюк П.А. Значение микроэлементов для стартово-пусковых механизмов прорастания семян // Биологическая роль микроэлементов в сельском хозяйстве и медицине. М.: Наука, 1974. С. 236–245
3. Ринькис В.Я. Макро- и микроэлементы в минеральном питании растений. Рига: Зинатне, 1979. С 43-46
4. Ширшова Т.И., Голубкина Н.А., Бешлей И.В., Матистов Н.В. Селенодефицит и возможности его сокращения. Аккумулирующие свойства некоторых представителей рода *Allium L.* по отношению к селену. // Известия Коми научного центра РАН. - 2011. - № 3(7). - С. 48–54.

УДК 635.92:581.143.6

**НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ РАЗМНОЖЕНИЯ И ОНТОГЕНЕЗ *BELAMCANDA CHINENSIS* (L.) DC.
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Мухаметвафина А.А., Зарипова А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический сад-институт Уфимского научного центра
Российской академии наук, г. Уфа, Россия

До последнего времени беламканда китайская *Belamcanda chinensis* (L.) DC. являлась единственным представителем рода *Belamcanda* семейства *Iridaceae*. На основании молекулярных исследований в 2005 году вид включен в род *Iris*, его действительное научное название – *Iris domestica* Goldblatt&Mabb. *B. chinensis* – травянистое короткокорневищное многолетнее растение высотой 80-150 см. В естественных условиях произрастает в Китае, Японии, Северной Индии, на территории России – юге Приморского края. Вид внесен в Красную книгу Российской Федерации [1], как находящийся под угрозой исчезновения, имеющий 1 категорию редкости и нуждающийся в охране, в Красную книгу Приморского края [2].

Растение интересно как красивоцветущее и декоративно-лиственное во многих странах Азии, Европы и Америки. Можно выращивать как горшечное растение. В Китае и Вьетнаме беламканда выращивается как ценное лекарственное растение.

В России *B. chinensis* практически неизвестна, хотя была испытана во многих ботанических садах, в частности в Москве, Пензе, Ростове-на-Дону, Ставрополе, Твери. *B. chinensis* устойчива при выращивании в теплоумеренной зоне средней полосы России. Некоторые авторы рекомендуют растения и для более северных районов. В условиях северо-запада средней полосы России основной проблемой является перезимовка растений в открытом грунте. В суровые зимы растения погибают, несмотря ни на какие способы защиты [3].

На первом этапе клонального микроразмножения беламканды китайской изучалась всхожесть семян *in vitro*, а также их лабораторная всхожесть (табл. 1). В культуре *in vitro* семена предварительно промывали в растворе детергента и ополаскивали водопроводной водой. В асептических условиях проводилась обработка 70%-ным спиртом в течение 1 мин, затем раствором 0,1%-ного диацета – 10 мин и трижды по 15 мин промывали дистиллированной автоклавированной водой. Опробованная схема стерилизации позволила получить до 90% неинфицированных семян.

Семена высаживали на безгормональную питательную среду Мурасиге и Скуга, которые содержали в темноте при температуре 5-6°C. У половины семян предварительно была удалена кожура.

Для определения лабораторной всхожести семена были высажены во влажный песок и поставлены на стратификацию в холодильник. По истечении 2 месяцев были выставлены в комнатные условия.

Таблица 1

Всхожесть семян <i>Belamcanda chinensis</i>	
Вариант опыта	Всхожесть, %
Семена без кожуры	91,67
Семена с кожурой	65,22
Чашки Петри	70,58

Как видно из таблицы 1, удаление семенной кожуры способствует более дружному прорастанию семян и повышению всхожести до 91,67%.

Нами исследованы особенности начальных этапов онтогенеза беламканды китайской в культуре *in vitro*. В онтогенезе нами выделены 3 периода (латентный, регенеративный и генеративный) и 6 возрастных состояний: семена, проросток, ювенильное, имматурное, виргинильное и генеративное.

Семена округлые 0,5 см в диаметре, покрытые черной блестящей кожурой, которая изнутри покрыта липким волокном. Кожура достаточно плотная, но легко снимается, так как неплотно прилегает к эндосперму. Мощный эндосперм окружает прямой зародыш. Семена беламканды китайской характеризуются глубоким физиологическим покоем и по литературным данным нуждаются в стратификации при 5-10°C в течение 2 мес.

Начало прорастания (рис. 1) в наших опытах наблюдалось на 99 день культивирования у семян без кожуры, у семян с кожурой – на 115 день (рис. 2 А), в чашках Петри – на 144 день. Но следует учесть, что начало прорастания в чашках Петри считалось с момента появления первого листа над почвой, тогда как в культуре *in vitro* с момента проклевывания. Разница между этими моментами составляла 30-35 дней. У семян без кожуры прорастание было более дружное – основная часть семян проросла в первую неделю, тогда как семена с кожурой продолжали прорастать в течение месяца, так же как и в чашках Петри. Пик прорастания в чашках Петри приходился на конец второй начало третьей недели (рис. 1).

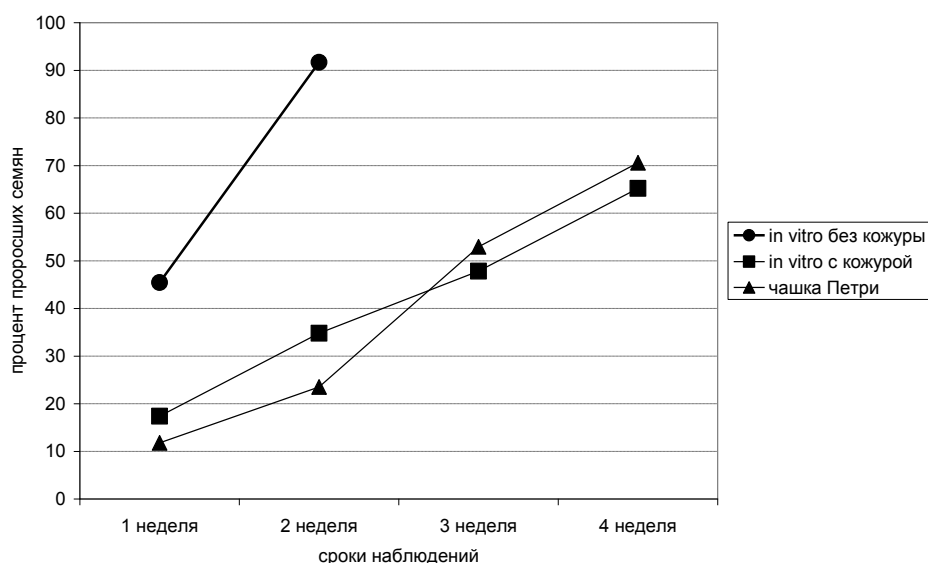


Рис. 1. График прорастания семян *Belamcanda chinense* (L.) DC.

Таким образом, семена беламканды китайской обладают высокой всхожестью. Однако, скарификация семян способствует более дружному прорастанию семян и повышению всхожести почти до 100 %.

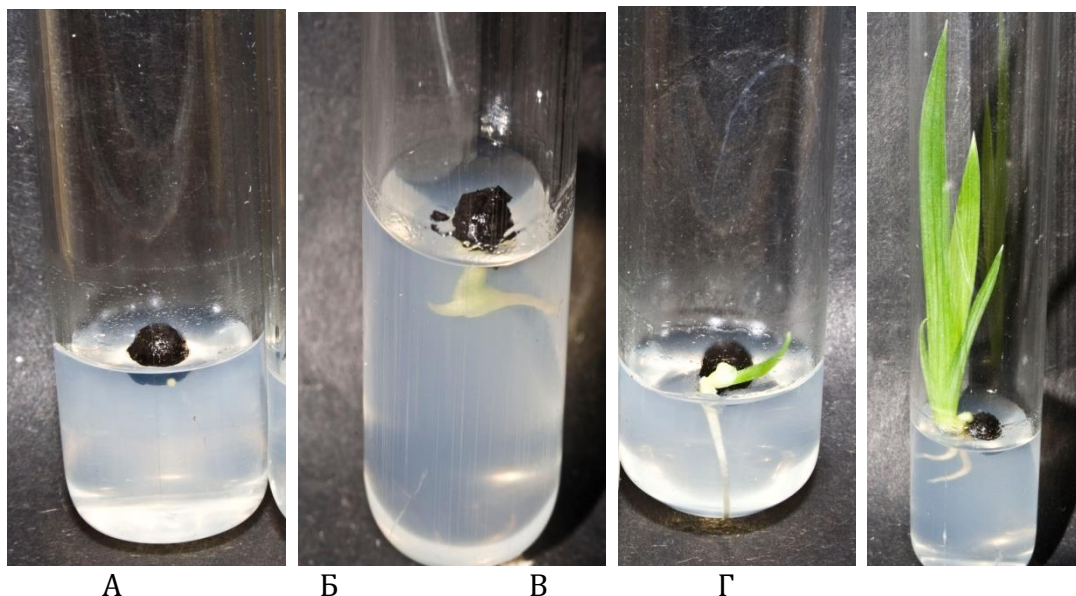
Развитие растений в культуре *in vitro* являлось более наглядным и дает больше представления об онтогенезе беламканды китайской.

Проросток состоит из первичного корня, короткого гипокотилия и семядоли, в основании которой располагается зародышевая почка (рис. 2 Б). Семядоля образована гаусторией, влагалищем и черешком, который связывает гаусториальную часть с влагалищем. Семядоля разрастается слабо и не выносятся на поверхность питательной среды. Длина черешка составляет 4-7 мм. Тип прорастания семян гипогеальный.

Ювенильные растения. Появление первого листа сигнализирует о переходе проростка в ювенильное состояние (рис. 2 В) и об автономном питании. Однако у проростков беламканды китайской эндосперм сохраняется в течение трех месяцев после прорастания, а гипокотиль в течение четырех месяцев, даже с появлением первого листа.

Для растений в имматурном состоянии характерно наличие розеточного побега с 3-4 листьями (рис. 2 Г). Листья узкие тонкие, напоминающие проростки ирисов. В этом состоянии были пересажены из условий *in vitro* в условия *ex vitro*. Приживаемость растений составила 100%.

На 7 – 8 месяце развития растения достигли виргинильной стадии. У особей начали появляться характерные для взрослых особей листья, которые увеличились в длину и ширину, их количество варьировало от 5 до 7 шт. У некоторых закладывалась одна почка, из которой формировалось дочернее растение.



А Б В Г

Рис. 2. Стадии развития *Belamcanda chinensis* (L.) DC. в культуре *in vitro*: А – начало прорастания; Б – стадия проростка; В – ювенильная стадия; Г – имматурная стадия

Через 9 мес. отмечен переход растений в генеративный период. Появился первый генеративный побег (рис. 3). Количество цветков на одном растении от 5 до 12 шт. Один цветок сохраняется в течение одного дня. Растения в условиях комнатной культуры доведены до стадии плодоношения. В трехгнездных коробочках образовалось от 3 до 11 семян.

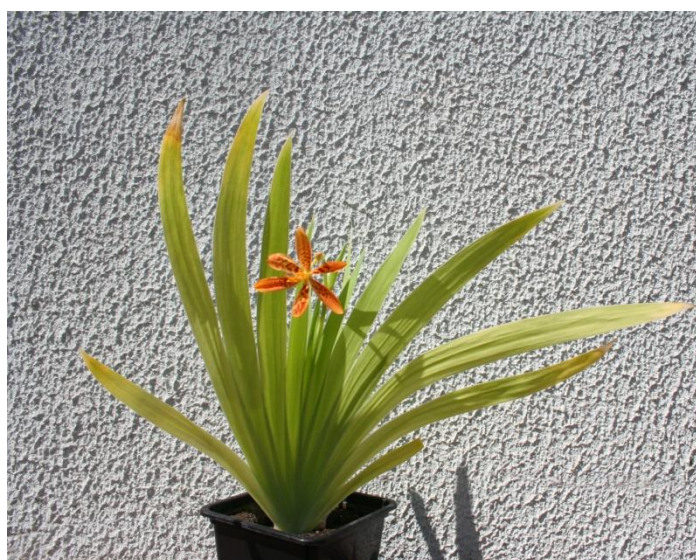


Рис. 3. Цветущее растение *Belamcanda chinensis* (L.) DC.

Таким образом, изучены начальные этапы онтогенеза беламканды китайской *Belamcanda chinensis* в культуре *in vitro*. Выделены 3 периода (латентный, регенеративный и генеративный) и 6 возрастных состояний: семена, проростки, ювенильное, имматурное, виргинильное и генеративное. Изучение всхожести семян лабораторной и в культуре *in vitro* показало, что удаление семенной кожуры способствует более дружному прорастанию семян и повышению всхожести до 91,67%. Разработан первый этап клонального микроразмножения *B. chinensis*: введение эксплантов в культуру *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М. В. Ломоносова; Гл. редколл.: Ю. П. Трутнев и др.; Сост. Р. В. Камелин и др. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 885 с.
 2. Красная книга Приморского края: Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Биолого-почвенный институт ДВО РАН. Владивосток, АВК «Апельсин», 2008. 688 с.
- Наумцев Ю. Короткая леопардовая жизнь. – АиФ на даче, - № 23 (162) от 03.12.2003 г.

УДК 574.42

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ (*Betula pendula* Roth),
ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В ГОРОДЕ УФА (РЕСПУБЛИКА БАШКОРТОСТАН)
ПО СРОКАМ НАСТУПЛЕНИЯ ЕЁ ФЕНОЛОГИЧЕСКИХ ФАЗ**

Николаева В. В.

ФГБОУ ВПО Башкирский Государственный Педагогический университет
им. М. Акмуллы, г. Уфа, Россия

Существует достаточное количество способов оценивать как состояние одного дерева в отдельности, так и древесного насаждения в целом. Но, к сожалению, большинство из них – контактные и подразумевают причинение какого – либо вреда исследуемому объекту. В связи с этим фактом, среди всех методов изучения уровня биологической устойчивости, выделяется фенологический метод, который в большинстве случаев подразумевает лишь визуальный осмотр исследуемого дерева (насаждений).

Объектом данного исследования является береза повислая (*Betula pendula* Roth) из семейства Betulaceae. Она приспособлена к низким температурам, не страдает от весенних заморозков, мало требовательна к почвам, может расти на бедных песчаных и каменистых почвах, проточных болотах. Светолюбива. Газоустойчива [1].

Широкое распространение березы повислой на территории города Уфа делает данный вид удобным модельным объектом для изучения смены фаз сезонной динамики, в связи с тем, что для древесных растений представительными могут считаться группы в несколько десятков деревьев [2].

В городе Уфа выделено 3 условные зоны различного аэротехногенного загрязнения [3]. I – северная часть г. Уфа, территория вокруг промышленных предприятий, с высоким уровнем аэротехногенного загрязнения окружающей среды, задымлением нефтяными газами с преобладанием углеводородов. II – центральная часть г. Уфа, с повышенным уровнем аэротехногенного загрязнения окружающей среды, с преоблада-

нием полиметаллического и углеводородного загрязнений. III – южная часть г. Уфа, зона относительного контроля со слабым и местами средним уровнем загрязнения.

Одной из критических фаз в жизни растения является фаза цветения в связи с тем, что в этот момент происходит выход на открытый воздух интенсивно растущего соцветия [4]. Аналогично, весной при распускании листовых почек происходит выход на открытый воздух кончиков первых листьев.

Фазы распускания листовых почек (РЛП), начала цветения (НЦ), массового цветения (МЦ) и окончания цветения (ОЦ) представлены в таблице.

Из таблицы видно, что фаза распускания листовых почек в 2013, также как и в 2014 гг. наступала практически одновременно во всех районах города вне зависимости от степени загрязнения.

Большинство фенологических фаз цветения, особенно в условиях повышенного загрязнения и относительного контроля два года подряд наступало одновременно вне зависимости от погодных условий.

Таблица.

Фенологические фазы цветения березы повислой в 2013-2014 гг.

Уровень загрязнения	Район г. Уфа	Год	РЛП	НЦ	МЦ	ОЦ	Продолжительность цветения, дн.
Высокий уровень аэротехногенного загрязнения	1- Орджоникидзевский	2013	16.4.	2.5.	4.5.	14.5.	13
		2014	28.4	2.5	3.5.	13.5	12
	2 – Калининский	2013	18.4	3.5.	5.5.	15.5.	13
		2014	28.4	4.5.	5.5.	14.5.	11
Повышенный уровень аэротехногенного загрязнения	3 – Октябрьский	2013	18.04.	5.5.	6.5.	16.5.	12
		2013	29.4	1.5.	4.5.	11.5.	11
	4 – Советский	2013	18.4.	29.4.	1.5.	10.5.	12
		2014	28.4	2.5	3.5.	11.5	10
Относительный контроль	5 – Кировский	2014	16.4.	2.5	3.5.	12.5	11
		2014	28.4	3.5	4.5.	11.5	9
	6 – Ленинский	2013	20.4	1.5.	3.5.	13.5.	13
		2014	27.4	4.5	6.5	13.5.	10
	7 – Демский	2013	16.4.	3.5.	6.5.	15.5.	13
		2014	28.4	2.5	3.5.	13.5	12

Из вышесказанного следует, что берёза повислая является биологически – устойчивой породой в условиях Уфимского промышленного центра, так как её критические фенологические фазы наступают одновременно независимо от погодных условий, а самое главное – вне зависимости от степени загрязнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хузина Г. Р. Влияние урбаноcреды на морфометрические показатели березы повислой *Betula pendula* Roth) // Вестник Удмуртского Университета. 2010. №. 3. С. 53 – 57.
2. Иваненко Б. И. Фенология древесных и кустарниковых пород. М.: Издательство сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов, 1962. – 127 с.

3. Гатин И. М. Естественное возобновление древесных пород в условиях техногенного загрязнения (на примере Уфимского промышленного центра): автореф. ... канд. биол. наук. Тольятти. 2006. 21 с.
4. Кулагин Ю. З. Индустриальная дендрэкология и прогнозирование. М.: Наука, 1985. – 118 с.

УДК 581.2

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭТИЛЕНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К *SEPTORIA NODORUM* BERK

Нужная Т.В.*, Веселова С.В., Максимов И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия

Введение

Салициловая кислота (СК) и этилен являются одними из основных растительных гормонов, индуцирующих защитные реакции растений против патогенов. Салицилат (СК)- и этилен-зависимые защитные ответы растений при патогенезе – два сигнальных пути, проявляющих антагонизм [1]. Из исследований на арабидопсисе известно, что СК-зависимый путь регуляции защитного ответа эффективен против биотрофных патогенов, а этилен-зависимый – против некротрофов [1]. Влияние этилена на СК неоднозначно и может быть как положительным [2], так и отрицательным [3]. Под строгим контролем гормонов, в том числе СК и этилена, находится про-/антиоксидантный статус растений [1, 4, 5]. В литературе много противоречивых данных о механизмах регуляции этилен-зависимых защитных ответов растений при патогенезе [1, 3, 6]. Однако, мало известно об участии этого гормона в регуляции про-/антиоксидантного статуса у однодольных растений при гембиотрофной инфекции.

Целью нашей работы было изучить состояние компонентов про-/антиоксидантной системы под воздействием СК, этефона (ЭТ) (химического предшественника этилена) и ингибитора рецепции этилена (1-МЦП) при формировании устойчивости растений пшеницы к грибу *Septoria nodorum* Berk.

Материалы и методы

Объектом исследований служили 7-суточные проростки мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух контрастных по устойчивости сортов Казахстанская 10 (Каз10) (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый), выращенных в лабораторных условиях на водной культуре и подвергнутых предпосевной обработке СК в концентрации 50 мкМ. Часть срезанных первых листьев проростков, помещенных в чашки Петри, обрабатывали раствором 1-МЦП ("AgroFresh Inc, Spring House PA", США) в концентрации 2 мМ, часть - раствором этефона ("Sigma", Германия) в концентрации 1,5 мМ, немедленно закрывали и помещали в темноту [4]. Через 24 ч листья инфицирова-

ли суспензией пикноспор агрессивного штамма гриба *S. nodorum* (10^5 спор/мл) из коллекции лаборатории.

Растительный материал (1:5 вес/об.) гомогенизировали в 0.05 М Na-фосфатном буфере (ФБ), pH 6.2, и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Супернатант отделяли центрифугированием при 15000 g (5415K “Eppendorf”, США). Концентрацию пероксида водорода определяли по методу [5], используя ксиленол оранжевый в присутствии Fe²⁺. Затем смесь центрифугировали 10 мин при 8000 g. Оптическую плотность комплекса измеряли при 560 нм на спектрофотометре BioSpec-Mini (“Shimadzu”, Япония). Активность ПО определяли микрометодом по окислению (*o*-) фенилендиамина (ОФД) в присутствии H₂O₂ [6] при 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Активность фермента выражали в оптических ед./мг белка. Содержание белка определяли по методу Бредфорд.

Автофлуоресценцию лигнина наблюдали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛСКМ) LSM-510 на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M (“Carl Zeiss”, Германия) в отрезках листьев, фиксированных в 96% этаноле. Для возбуждения автофлуоресценции использовали аргоновый лазер 30 мВт с длиной волны 488 нм, дихроичным зеркалом 490 нм и пропускающим светофильтром 505 нм [7]. Накопление H₂O₂ в инфицированных тканях листьев определяли через 24 ч после инокуляции путем витального окрашивания 3,3-диаминобензидином (ДАБ) [8]. Для регистрации накопления H₂O₂ использовали цифровой микроскоп VZ8100E (“Keyence”, Япония).

Площадь зоны поражения измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html). Все опыты проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторностях. При обработке результатов использовали компьютерные программы Statistica 6.0 (“StatSoft”, Россия). В таблицах и на рисунке приведены средние значения биологических повторов и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

Анализ развития септориоза на листьях пшеницы показал, что обработанные этефоном растения двух контрастных сортов Каз10 и Ом35, становились более чувствительны к грибу *S. nodorum*, так как на листьях развивались пикниды гриба, окруженные большими зонами хлорозов, занимающих до 50 и 40% площади листа, соответственно, у восприимчивого и устойчивого сорта (табл. 1). Предпосевная обработка семян СК и обработка листьев ингибитором рецепции этилена 1-МЦП приводила к многократному торможению развития болезни, зоны поражения с некрозами, но без хлорозов и пикнид занимали от 2 до 10% площади листа у обоих сортов (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние салициловой кислоты и этилена на развитие септориоза в листьях контрастных по устойчивости сортов растений пшеницы через 9 сут после инфицирования.

Площадь поражения, мм ²	Контроль	СК	ЭТ	1-МЦП
Казахстанская 10	82,6±6,0	15,1±3,5	111,8±3,0	2,6±0,6
Омская 35	16,7±2,5	6,8±1,9	95,2±7,6	2,9±0,9

СК- салициловая кислота, ЭТ – этефон, 1-МЦП -1-метилциклопропен.

Полученные нами результаты говорят о положительном влиянии СК и отрицательном влиянии этилена на защитный ответ растений пшеницы при гемибиотрофной инфекции, что согласуется с данными литературы [1, 3]. Известно, что у нечувствительных к этилену растений снижены симптомы развития различных болезней [3].

Таблица 2.

Влияние салициловой кислоты и этилена на генерацию H_2O_2 в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы при инфицировании грибом *S. nodorum*.

Время после инфицирования, ч			Вариант	Время после инфицирования, ч		
24	48	72		24	48	72
Казахстанская 10, H_2O_2 , мкМ / г сырой массы				Омская 35, H_2O_2 , мкМ / г сырой массы		
15.9±0.9	14.4±2.3	17.2±1.7	Контроль	15.7±0.8	23.1±0.5	23.1±0.6
24.2±2.8	21.7±2.9	10.9±1.3	Инфицирование	38.1±0.3	43.7±0.8	31.7±0.8
33.1±4.6	54.1±6.0	32.3±2.9	СК	28.3±0.1	26.0±1.7	25.9±2.0
38.1±4.3	44.4±4.6	26.8±2.9	СК+Инф	42.8±0.6	45.1±1.6	28.3±2.9
12.9±1.0	23.2±1.5	14.7±1.6	ЭТ	12.3±0.5	7.9±1.1	9.2±1.4
7.4±1.6	11.5±1.9	9.0±1.1	ЭТ+Инф	21.6±0.1	13.8±0.8	13.7±1.7
20.0±2.0	36.4±4.6	25.3±3.2	1-МЦП	33.9±0.6	26.3±1.5	20.8±1.2
32.5±2.8	39.4±5.8	21.3±2.5	1-МЦП+Инф	39.02±0.5	36.6±0.7	29.4±1.1

В растительных тканях в ответ на внедрение патогена выявляется целый ряд сигнальных соединений, запускающих каскад ответных биохимических реакций [9]. Такую роль может выполнять пероксид водорода (H_2O_2), вызывающий окислительный взрыв. Инфицирование индуцировало небольшое и транзиторное накопление H_2O_2 в листьях восприимчивого сорта Каз10 через 24 ч после инфицирования, тогда как в листьях устойчивого сорта Ом35 генерация H_2O_2 была не только выше, но и поддерживалась на протяжении всего эксперимента на высоком уровне (табл.2), как это было показано для устойчивых линий ячменя, пораженных мучнистой росой [10]. Гистохимический анализ накопления H_2O_2 в листьях пшеницы показал, что значительная его генерация наблюдалась в зоне проникновения мицелия патогена у устойчивого, но не восприимчивого сорта (рис. 1а, д).

В обработанных этефоном инфицированных листьях генерация H_2O_2 подавлялась на протяжении всего эксперимента, но с большей интенсивностью у восприимчивого сорта Каз10 (табл. 2), что также подтвердил гистохимический анализ накопления H_2O_2 в зоне поражения (рис. 1в, ж).

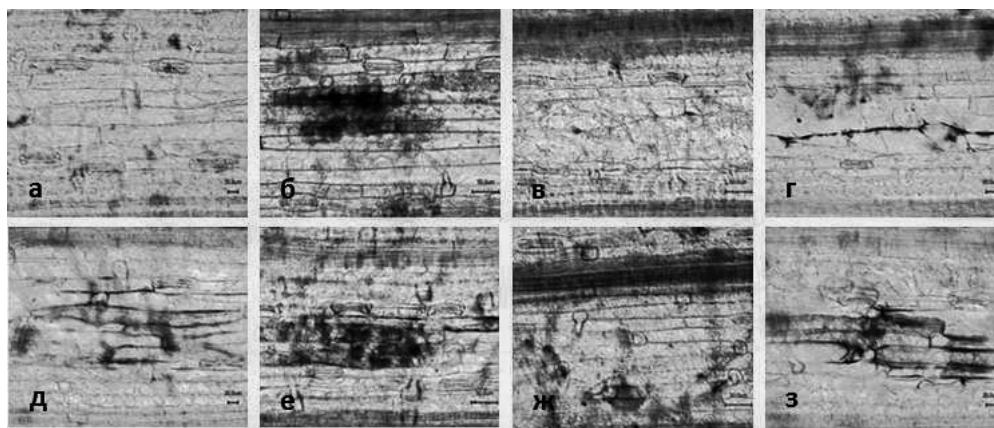


Рис.1. Влияние СК и этилена на локальную генерацию H_2O_2 в листьях пшеницы сортов Казахстанская 10 (а,б,в,г) и Омская 35 (д,е,ж,з) через 24 ч после инфицирования грибом *S. nodorum*. Инфицирование – а, д; СК+инф – б, е; этефон+инф – в, ж; 1-МЦП+инф – г, з.

Обработка семян СК и обработка листьев пшеницы 1-МЦП приводила к интенсификации накопления H_2O_2 в листьях обоих сортов через 24 и 48 ч после инфицирования, причем более резко и продолжительно у восприимчивого сорта (табл. 2), такие же результаты были получены с помощью гистохимического анализа накопления H_2O_2 в листьях пшеницы (рис. 1).

Известно, что СК, ингибируя каталазу, способствует накоплению H_2O_2 [11]. Однако, до сих пор остается не выясненным индуцирует ли этилен синтез H_2O_2 , хотя иногда инфицирование сопровождается параллельным накоплением этилена и H_2O_2 [12]. Так было показано, что этилен принимал участие в механизмах формирования патоген-индуцированных некрозов в растительных тканях, способствующих последующей колонизации растений [3, 12]. Обнаруженное в данной работе значительное транзитное накопление H_2O_2 у обработанных 1-МЦП и ингибирование накопления H_2O_2 у обработанных этефоном инфицированных растений подтверждает данные, полученные на трансгенных растениях с нарушенным синтезом и рецепцией этилена [12].

Образование и утилизация АФК находится под контролем про-/антиоксидантных ферментов, одним из таких ферментов является пероксидаза [13]. Наши данные показали, что инфицирование приводило к постепенному повышению активности фермента в листьях обоих сортов в течение всего эксперимента, но с различной интенсивностью (рис. 2). Обработка СК, также как и 1-МЦП стимулировала активацию ПО в инфицированных листьях, а этефон ингибировал активность фермента на протяжении всего эксперимента у обоих сортов (рис. 2). О возможности СК непосредственно влиять на активность ПО ранее сообщалось и другими исследователями [11, 14]. Однако, влияние этилена на активность пероксидаз в процессах инфицирования растений не изучалось.

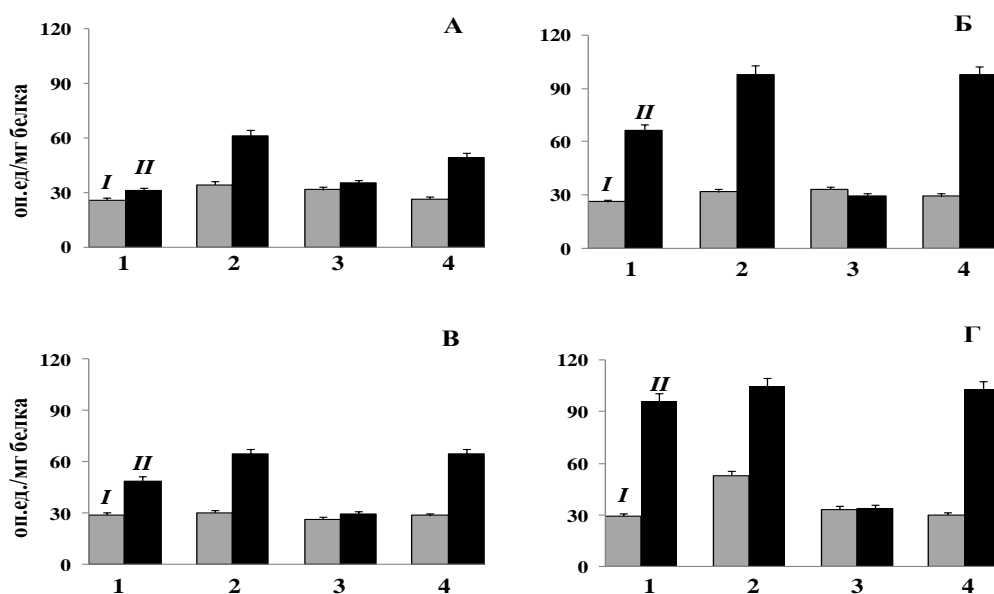


Рис. 2. Влияние СК и этилена на активность пероксидазы в листьях пшеницы сортов Казахстанская 10 (А, Б) и Омская 35 (В, Г) через 24 (А, В) и 72 (Б, Г) часа после инфицирования грибом *S. nodorum*: I-контроль, II-инфицирование. 1 - контроль, 2 – СК, 3 – этефон, 4 – 1-МЦП.

Формирование лигнина, катализируемое растительными ПО, с одной стороны - наиболее надежный способ утилизации фитотоксичных концентраций АФК и фенольных соединений, а с другой - способствует образованию механического барьера для патогена, не разрушаемого его гидролазами [13].

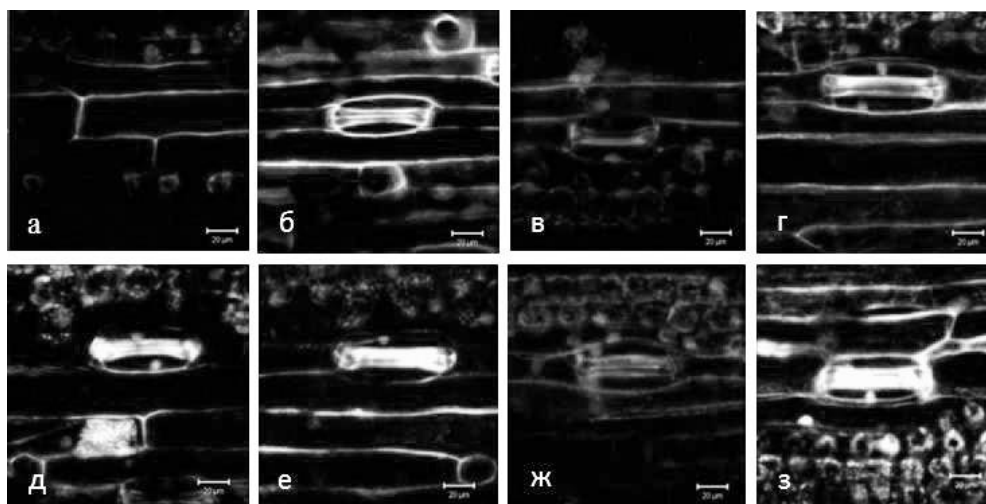


Рис. 3. Влияние салициловой кислоты и этилена на отложение лигниноподобных фенольных соединений в клеточных стенках листьев двух контрастных по устойчивости сортов пшеницы Казахстанская 10 (а,б,в,г) и Омская 35 (д,е,ж,з) через 3 сут после инфицирования грибом *S. nodorum*. Обозначения такие же как на рис. 1.

В наших экспериментах через 3 сут после заражения в клеточных стенках тканей листа восприимчивого сорта Каз10 автофлуоресценция лигнина была выражена значительно слабее, чем у устойчивого сорта Ом35 (рис. 3). Обработка растений

пшеницы СК и 1-МЦП приводила к увеличению отложения лигнина в клеточных стенках инфицированных листьев обоих сортов (рис. 3), что совпадало с интенсивной генерацией H_2O_2 (рис. 1) и высокой активностью ПО (рис. 2) в этих вариантах. Так на растениях картофеля, инфицированных фитофторой, с помощью гистохимических методов была выявлена связь между накоплением фенольных соединений и активностью пероксидазы в зоне заражения, что коррелировало с повышением устойчивости таких растений [14]. Обработка этефоном уменьшала степень лигнификации клеточных стенок у обоих сортов (рис. 3), что совпадало с ингибированием как генерации H_2O_2 (рис. 1), так и активности ПО (рис. 2).

Таким образом, увеличение устойчивости под влиянием обработок СК и 1-МЦП коррелировало с высокой генерацией H_2O_2 и увеличением активности ПО, что приводило к более интенсивному отложению лигнина. При обработке этефоном наблюдались противоположные реакции. Данные результаты говорят о положительном влиянии СК и отрицательном влиянии этилена на защитный ответ растений пшеницы при гемибактериальной инфекции, проявляющийся в регуляции активности компонентов про-/антиоксидантной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №14-04-97079) и ФЦП (Госконтракт № 14.BVV.21.0063).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ding L., Xu H., Yi H., Yang L., Kong Z., Zhang L., Xue S., Jia H., Ma Z. Resistance to Hemibiotrophic *F. graminearum* Infection Is Associated with Coordinated and Ordered Expression of Diverse Defense Signaling Pathways // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. e19008.
2. Leon-Reyes A., Spoel S.H., De Lange E., Abe H., Kobayashi M., Tsuda S., Millenaar F., Welschen R., Ritsema T., Pieterse C.M. Ethylene modulates the role of nonexpressor of pathogenesis-related genes1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling // *Plant Physiol.* 2009. V. 149(4). P. 1797-809.
3. Chen H., Xue L, Chintamanani S., Germain H., Lin H., Cui H. et al. Ethylene insensitive3 and Ethylene insensitive3-like1 repress salicylic acid induction deficient2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in Arabidopsis // *The Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 2527-2540.
4. Almagro L., Gomez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcello A., Pedreno M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions // *J. Exp. Botany*. 2009. V. 60. P. 377 – 390.
5. Barna B., Fodor J., Harrach B.D., Pogány M., Király Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens // *Plant Physiol. Biochem.* 2012. V. 59. P. 37-43.
6. Wi S.J., Ji N.R., Park K.Y. Synergistic Biosynthesis of Biphasic Ethylene and Reactive Oxygen Species in Response to Hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in Tobacco Plants // *Physiol. Plant*. 2012. V. 159. № 1. P. 251–265.
7. Vysotskaya L., Wilkinson S., Davies W., Arkhipova T., Kudoyarova G. The effect of competition from neighbours on stomatal conductance in lettuce and tomato plants // *Plant Cell Environ.* 2011. V. 34. № 5. P. 729–737.
8. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L. et al. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca^{2+} // *New Phytologist*. 2001. V. 151. P. 185 – 194.
9. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Яраш Н.П. // Методы биохимического исследования растений / Ред. А.И. Ермакова. Л.: Агропромиздат. 1987. 430с.
10. Efetova M., Zeier J., Riederer M., Lee C.-W., Stingl N., Mueller M., Hartung W., Hedrich R., Deeken R. A central role of ABA in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. № 3. P. 853–862.

11. Vleeschauver D.D., Yinong Y., Casiana V.C., Monica H. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. // *Plant Physiol.* 2010. V.152, P. 2036-2052.
12. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений // М.: Наука. 2002. 294 с.
13. Kawano T., Furuichi T. Salicylic acid as a defence-related plant hormone: Roles of oxidative and calcium signaling paths in salicylic acid biology // *Salicylic acid: A plant Hormone*. Ed. Hayat S., Ahmad A. 2007. Springer. Berlin. Heidelberg. P. 277 – 322.
14. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Кузьмина О.И. Структурно-функциональные особенности изопероксидаз растений // *Биохимия.* 2011. Т.76. №6. С.749-763.

УДК: 633.11:581.143

ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ КАЛЛУСА ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО

Пыкало С.В.¹, Зинченко М.А.², Волощук С.И.¹, Дубровная О.В.²

¹Мироновский институт пшеницы имени В.Н. Ремесло НААН Украины

²Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Введение. Сравнительно новый ботанический вид – тритикале – считается перспективной сельскохозяйственной культурой, на зерно которой с каждым годом все больше растет спрос на мировом рынке [1]. В связи с этим ее возделывают почти во всех почвенно-климатических зонах, где среди прочих абиотических факторов, лимитирующих ее урожайность, значительный ущерб приносит засуха [2]. В борьбе с данными влияниями сорт является самым дешевым и доступным средством роста урожайности. Основным методом создания новых сортов до настоящего времени остается классическая адаптивная селекция [3]. Тем не менее, она характеризуется чрезмерной трудоемкостью и длительным сроком отбора: новый сорт приходит на поля и начинает приносить ощутимую прибыль лишь через 12-20 лет [4]. Современные технологии, включающие в себя генную инженерию, радиологический и химический мутагенез и культуру тканей *in vitro*, позволяют значительно сократить сроки выведения новых сортов [5]. С использованием данных методов появляется возможность повысить необходимую для адаптации к осмотическому стрессу клеточную устойчивость, что обеспечивает высокую полевую выживаемость растений, являющуюся самым значительным элементом продуктивности, характеризующим их хорошую или плохую адаптивность [6]. Вместе с тем методы генетической модификации имеют ряд недостатков: дороговизна материалов, сложность процедур и ограниченность введения полученных растений в рацион человека из-за возможного вреда здоровью [7]. Таким образом, культура изолированных растительных тканей *in vitro* представляется наиболее экологически безопасной и малозатратной технологией отбора адаптивных форм зерно-

вых, в том числе тритикале, использующей природные резервы изменчивости растений [8].

Целью нашей работы было изучить влияние осмотического стресса на прирост биомассы каллуса тритикале озимого в культуре апикальных меристем побегов с использованием маннита в качестве стресс-фактора.

Материалы и методы. Материалом исследований были сорта тритикале озимого Обрий, Миролан, АДМ 11, линии 38/1296, 1324 и гибрид F₂ 809, которые были взяты из рабочей коллекции МИП им. В.Н. Ремесло НААН Украины. Для получения донорных растений семена сначала стерилизовали 1 %-ным раствором KMnO₄ в течении 3 мин. Затем в течении 1 мин их выдерживали в 1 %-ном растворе AgNO₃ и помещали в 96 %-ный этанол на 1 мин. Конечным этапом стерилизации было 3-разовое промывание стерильной дистиллированной водой. Простерилизованные семена проращивали на свету при 24 °С на безгормональной среде Мурасиге-Скуга (МС) [9]. Как эксплант использовали апикальную меристему побега 3-суточных стерильных проростков. Для каждого генотипа было взято по 160 эксплантов, размер которых варьировал в пределах 1,5-2,0 мм. Культуру каллусной ткани получали на среде МС, которая дополнительно содержала L - аспарагин -150 мг/л, AgNO₃ - 10 мг/л и 2 мг/л 2,4-Д. Экспланты культивировали при 26° С в темноте в течении трех недель. Затем их переносили на свет и дальше выращивали при освещении 3-4 клк, относительной влажности воздуха 70% и 16-часовом фотопериоде еще две недели. Полученные каллусы пересаживали в чашки Петри на селективную среду и культивировали в течении 4 недель (1 пассаж), определяя при этом прирост их биомассы. Как селективный агент применяли низкомолекулярный маннит, который добавляли в среду МС в концентрациях 0,2; 0,4; 0,6 и 0,8 М. Контролем служила среда без маннита. Экспериментально полученные данные обрабатывали методом статистического анализа [10].

Результаты исследований и их анализ. Маннит – это белое кристаллическое, растворимое в воде, органическое соединение, которое широко используется как осмотический агент. Следует отметить, что по сравнению с непроникающим полиэтиленгликолем, маннит проникает в растительную клетку и снижает нормальный водный потенциал, чем вызывает обезвоживание и торможения многих физиологических и метаболических процессов [11]. Нами было исследовано влияние маннита концентрацией 0,2-0,8 М на прирост сырой массы каллусов тритикале озимого (табл. 1).

В ходе исследований было установлено, что ингибирование роста каллусной культуры было отмечено уже при концентрации маннита 0,2 М во всех генотипов, а при увеличении концентрации с 0,2 до 0,8 М привес каллусов постепенно уменьшался. Концентрация 0,2 М незначительно повлияла на прирост биомассы каллусов линии 38/1296 (потеря только 8,3%), чего нельзя сказать о сорте АДМ 11, у которого потеря сырой массы каллусов на данном варианте составила 34,3%, то есть третью часть. Остальные же генотипы занимали промежуточное положение по приросту биомассы в данном диапазоне концентраций. На вариантах с 0,4 М маннита сырая масса каллусов в линии 38/1296 уменьшилась почти в 1,5 раза, у сортов Обрий, Миролан и гибрида F₂ 809 в 2 раза, в линии 1324 - в 2,5 раза, а в сорта АДМ 11 аж в 3 раза.

При увеличении концентрации осмотика до 0,6 М угнетение роста было выражено еще сильнее и на частях каллусов появлялись зоны некроза. На селективных средах с 0,8 М маннита рост каллуса присутствовал только в линии 38/1296, в остальных же генотипов наблюдалась массовая гибель клеток, особенно это касается сорта АДМ 11, где прирост биомассы каллусов вообще отсутствовал.

Таблица 1.

Прирост биомассы каллуса генотипов тритикале озимого

Генотип		Вариант опыта				
		Контроль	0,2 М	0,4 М	0,6 М	0,8 М
Обрий	мг	292,8±9,1	258,0±6,4	171,9±9,2	75,5±4,7	34,8±3,1
	%	100	88,1±2,2	58,7±3,1	25,8±1,6	11,9±1,1
Миролан	мг	288,5±6,7	246,4±9,1	160,1±9,4	67,8±5,1	30,6±2,1
	%	100	85,4±3,2	55,5±3,3	23,5±1,8	10,6±0,7
АДМ 11	мг	279,2±7,8	183,3±8,1	96,9±6,1	43,6±4,1	-
	%	100	65,7±2,9	34,7±2,2	15,6±1,5	-
38/1296	мг	297,4±7,4	272,7±9,1	218,5±8,1	99,3±4,1	45,8±3,1
	%	100	91,7±3,1	73,4±2,7	33,4±1,4	15,4±1,0
1324	мг	286,0±7,1	210,8±7,5	120,7±7,4	56,6±5,1	24,9±2,1
	%	100	73,7±2,6	42,2±2,6	19,8±1,8	8,7±0,7
F ₂ 809	мг	291,5±6,3	227,1±8,1	138,8±9,0	61,8±4,1	27,6±0,7
	%	100	77,9±2,8	47,6±3,0	21,2±1,4	9,5±3,1

При проведении опыта нами было установлено, что для каждой из концентраций маннита порядок ранжирования генотипов тритикале по приросту сырой массы каллусов был следующим: 38/1296 > Обрий > Миролан > F₂ 809 > 1324 > АДМ 11. Исходя из этого, можно утверждать, что наибольший прирост биомассы каллуса во всех вариантах опыта имела линия 38/1296, что указывает на ее меньшую чувствительность к воздействию осмотического вещества. Сорта Обрий и Миролан также имели сравнительно высокую прибавку каллусов в весе во всех вариантах опыта. Наибольшая же потеря сырой массы каллусов наблюдалась у сорта тритикале АДМ 11, поскольку подавляющее их большинство уже при 0,4 М маннита погибали.

Следует отметить, что при высоких концентрациях осмотика проявлялась выраженная гетерогенность каллусов: часть клеток еще сохраняла способность к пролиферации, в то время как другая уже погибла. Одной из возможных причин такой гетерогенности каллуса может быть разный уровень ploидности клеток.

Заключение. На основании полученных результатов опыта установлено, что с увеличением концентрации маннита с 0,2 до 0,8 М во всех исследуемых генотипов

наблюдается явное угнетение роста каллусной культуры озимого тритикале, что свидетельствует о токсическом влиянии стрессового фактора. Разная генотипическая реакция на осмотический стресс в культуре апикальных меристем побегов тритикале озимого проявлялась в разной реакции каллусов на действие селективного фактора. Каллусы отобранных генотипов характеризовались способностью к росту на селективной среде с осмотически активным веществом и проявляли признак устойчивости, стабильно сохраняя прирост биомассы. Линия 38/1296 может быть использована, как ценный материал для дальнейшей селекции тритикале озимого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волощук С.І. Удосконалення методів масового отримання рекомбінантних дигаметоїдних ліній тритикале / С.І. Волощук, О.О. Заліський, Г.Д. Волощук // НБТ МІП ім. В.М. Ремесла. – 2012. – Вип. 11. – С. 320 – 334.
2. Шленкер Р. Успехи в селекции тритикале – результат международного сотрудничества / Р. Шленкер, Э Шекке // Международный агропромышленный журнал. – 1991. – № 1. – С. 43–45.
3. Щипак Г.В. Продуктивность озимых сортов тритикале Харьковской селекции / Г.В. Щипак, Н.С. Шевченко, Э.Г. Иванченко // Зерновые культуры. – 1997. – № 4. – С. 13 –14.
4. Сечняк Л.К. Тритикале / Л.К. Сечняк, Ю.Г. Сулима; Всесоюз. акад. с.-х. наук им. Ленина. – М.: Колос, – 1984. – 317 с.
5. Dorffling K. *In vitro* selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance / K. Dorffling, H. Dorffling, G. Lesselich // Journal of Plant Physiology. – 1993. – V. 142. – P. 222–225.
6. Ahloowalia B.S. Induced mutations. A new paradigm in plant breeding / B.S. Ahloowalia, M. Maluszynski // Eu-phytica. – 2001. – V. 118. – P. 167–173.
7. Фридт В. Генная инженерия: возможности и ограничения / В. Фридт // Новое сельское хозяйство. – 2005. – № 1. – С. 62–65.
8. Дубровна О.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля / О.В. Дубровна, Б.В. Моргун // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 463–475.
9. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Phisiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–479.
10. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
11. Генерозова И.П. Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков гороха, подвергнутых водному стрессу / И.П. Генерозова, С.Н. Мавевская, А.Г. Шугаев // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 1. – С. 45–52.

УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЦИНКА

Рахматуллина С.Р., Еникеев А.Р.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия

Введение

Проблема устойчивости высших растений является одной из приоритетных в современной биологии, в связи с ростом антропогенного загрязнения. Среди многочисленных загрязнителей особое место занимают тяжелые металлы (ТМ), которые нарушают физиолого-биохимические процессы в клетках. Тяжелые металлы в соответствующих концентрациях являются сильными стресс-факторами и одними из главных природных токсикантов [Щербаков и др., 2013]. Особый интерес исследователей привлекают эссенциальные элементы, которые в следовых количествах необходимы для метаболизма, роста и развития растений, тогда как в высоких концентрациях они токсичны для живых организмов [Pilon et al., 2009]. К такому типу металлов принадлежит цинк (Zn). Цинк относится к необходимым микроэлементам, так как является кофактором многих ферментов, участвующих в метаболизме азота, фотосинтезе, биосинтезе ауксина, синтезе нуклеиновых кислот, белков и других процессах [Rout, Das, 2003]; активно вовлекается в клеточный метаболизм, благодаря его присутствию в молекулах многих белков [Wang et al., 2009]; играет важную роль в стабилизации плазматических мембран и поддержании их целостности [Cakmak, Marschner, 1988]. В индустриальных странах Zn является одним из наиболее важных металлов-загрязнителей [Ли и др., 2008]. При повышенных концентрациях Zn, как и другие тяжелые металлы, может оказывать токсическое действие на самые разнообразные физиологические процессы, что может приводить к нарушению роста и морфогенеза растений [Rout, Das, 2003]. Влияние ТМ на растительный организм изучается в комплексе с регуляторами роста и протекторными веществами, в том числе и с нитропруссидом натрия (SNP), который активно воздействует на морфофизиологические процессы в растениях. Нитропруссид натрия активизирует рост растений при засухе, облучении ультрафиолетом В; у *Arabidopsis thaliana* ускоряет рост первичного корня; индуцирует формирование корневых волосков, боковых и придаточных корней; ингибирует удлинение гипокотыля и междоузлий у проростков *Arabidopsis* и *Lactuca sativa*, выращенных в темноте [Beligni, Lamattina, 2002; Красиленко и др., 2010]. Обработка проростков *Z. mays* нитропруссидом натрия усиливает поглощение и транспорт K^+ , ослабляя одновременно поглощение и транспорт Na^+ , чем предотвращает отток электролитов [Zhang et al., 2004]. SNP оказывает положительное влияние на рост растений томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [Хайят и др., 2010]; способен имитировать эффект ИУК, индуцируя органогенез дополнительных корней *de novo* у эксплантов *Cucumis sativus* с одинаковой анатомической структурой [Correa-Aragunde et al., 2006]. Известна протекторная роль нитропрусида натрия при действии на растения некоторых стрессовых факторов [Чжан и др., 2008]. Так, обработка проростков пшеницы нитропруссидом натрия устраняла эффек-

ты токсикоза, вызываемые никелем в работе Wang с соавторами (2007) и алюминием в работе Чжан с соавторами (2008) [Карпец и др., 2011]. Целью данной работы было изучение влияния экзогенного нитропрусида натрия на морфофизиологические показатели у проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казахстанская 10, выращенных в норме и условиях воздействия тяжелого металла цинка. Задачами работы являлись: 1) изучение действия нитропрусида натрия на накопление массы побегов и корней (измерение сухой массы) под воздействием цинка, 2) расчет на основе морфологических параметров относительной скорости роста (ОСР).

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили растения пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Казахстанская 10). Для изучения влияния нитропрусида натрия на защитные свойства растений пшеницы применяли раствор этого вещества в концентрации 40 мкМ/л. Семена проращивали в термостате при температуре 28⁰С. Через сутки после замачивания семена с одинаково развитыми корнями переносили на стеклянные плотики на дистиллированную воду. На 3 сутки (с момента термостатирования) в сосудах с растениями, воду заменяли раствором Хогланда – Арнона (0,5 н). Питательная смесь была составлена по прописи Хогланда-Арнона [Гродзинский, Гродзинский, 1973] с добавлением цитрата железа (0,1 мг/л). Растения выращивали при освещении люминесцентными лампами ЛД-20 и лампами накаливания («УЛЗ», Россия), освещенность 120 Вт/м², светопериод 16 ч, средняя температура воздуха 24±2⁰С. На 9 сутки растения подвергались воздействию соли цинка. В ходе работы измеряли сухую массу побега и корня (у 14-суточных растений). Сухую массу определяли после высушивания частей растений до воздушно сухого состояния при 90⁰С в течение 24 часов. На основе морфологических параметров рассчитывали относительную скорость роста (ОСР) (RGR, англ. relative growth rate), которую определяли как показатель прироста биомассы на единицу существующей: $RGR = \frac{W_2 - W_1}{W_1 \Delta t}$

где W_1 – вес исходный; W_2 – вес конечный [Усманов и др., 2001].

Результаты исследований и их анализ

Сухой вес побегов и корней у обработанных цинком проростков пшеницы был ниже, чем у контрольных растений (в 1,113 и 1,071 раза, соответственно) (Рис. 1.). Ингибирование роста связано с окислительным стрессом, что было показано в работе Красиленко и др., 2010. Известно, что высокие концентрации цинка оказывают ростингибирующее действие, влияя на протекание метаболических процессов в клетках [Ли и др., 2008; Кожевникова и др., 2009]. Обработка нитропрусидом натрия проростков пшеницы при совместном действии цинка оказывала положительный эффект на рост побегов и корней. Нитропрусид натрия на среде с цинком увеличивал процесс роста, как у побегов, так и у корней (в 1,148 и 1,185 раза, соответственно), по сравнению с растениями, выращенными на цинке (Рис. 1.). Нитропрусид натрия предотвращает токсическое действие ТМ вследствие блокирования развития окислительного стресса и снимает губительное для роста токсическое действие цинка. Подобные эффекты отмечены для корней *L. luteus* [Копыра, Gwozdz, 2003], для листьев *O. sativa* [Wang, Yang, 2005], для корней *Cassia tora* [Wang, Yang, 2005].

На основе морфологических параметров рассчитывали относительную скорость роста. Относительная скорость роста побегов и корней у обработанных цинком проростков пшеницы была ниже, чем у контрольных растений (в 1,660 и 1,498 раза, соответственно) (Рис. 2.). Нитропрусид натрия на среде с цинком увеличивал относитель-

ную скорость роста, как у побегов, так и у корней (в 1,616 и 1,696 раза, соответственно), по сравнению с растениями, выращенными на цинке (Рис. 2.). Нитропруссид натрия снимает губительное для роста токсическое действие цинка и стимулирует ОСР.

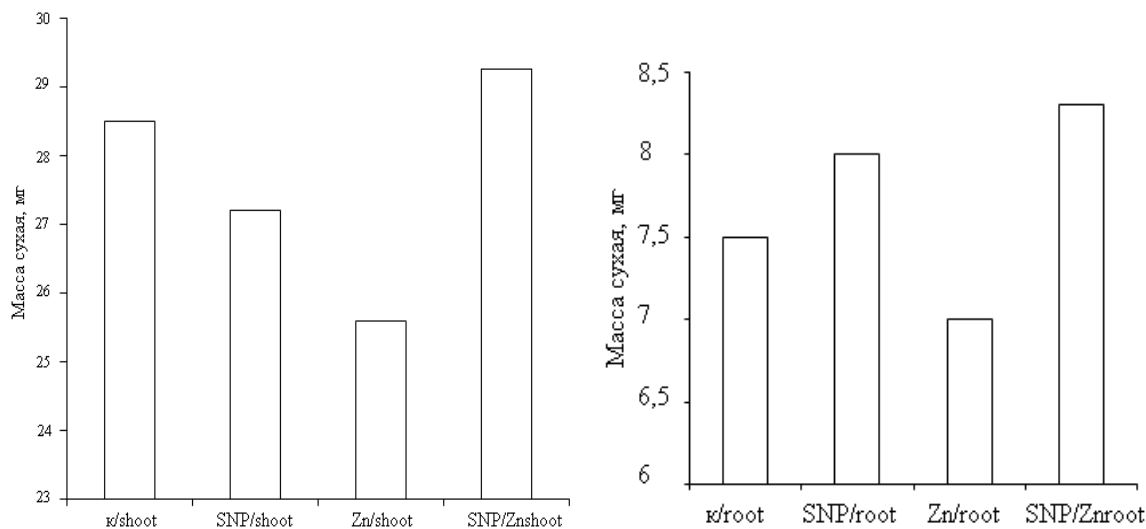


Рис. 1. Влияние нитропруссид натрия на накопление массы в побегах (shoot) и корнях (root) растений пшеницы в норме и при добавлении в среду цинка. К – контроль; SNP – нитропруссид натрия; Zn – цинк.

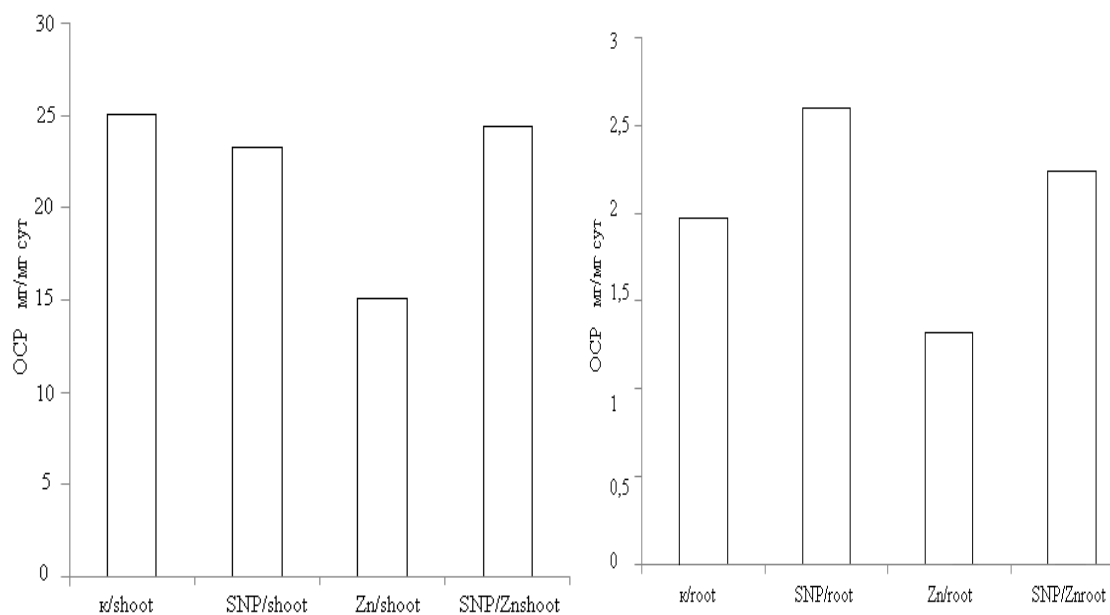


Рис. 2. Влияние нитропруссид натрия на относительную скорость роста (ОСР) в побегах (shoot) и корнях (root) растений пшеницы в норме и при добавлении в среду цинка. К – контроль; SNP – нитропруссид натрия; Zn – цинк.

Заключение

Таким образом, нитропруссид натрия предотвращает токсическое действие цинка и оказывает ростстимулирующее действие в ответ на окислительный стресс, что согласуется с литературными данными [Красиленко и др., 2010]. Нитропруссид натрия в растительных клетках является важным протекторным веществом, задействованным в реакциях растений на абиотические стрессоры, такие как тяжелые металлы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Щербаков А.В., Рахматуллина С.Р., Чистякова-Мавлетова М.В., Усманов И.Ю. Изменчивость антиоксидантной активности Можжевельника казацкого в градиенте содержания ионов меди на Южном Урале // Вестник Башкирского университета. 2013. Т. 18. № 4. С. 1081 – 1084.
2. Pilon M., Cochu C.M., Ravet K., Abdel-Ghany S., Gaymard F. Essential Transition Metal Homeostasis in Plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 347 – 357.
3. Rout G.R., Das P. Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc // Agronomie. 2003. V. 23. P. 3 – 11.
4. Wang C., Zhang S.H., Wang P.F., Hou J., Zhang W.J., Li W., Lin Z.P. The Effect of Excess Zn on Mineral Nutrition and Antioxidative Response in Rapeseed Seedling // Chemosphere. 2009. V. 75. P. 1468 – 1476.
5. Cakmak I., Marschner H. Increase in Membrane Permeability and Exudation in Roots of Zinc Deficient Plants // J. Plant Physiol. 1988. V. 132. P. 356 – 361.
6. Ли Т.К., Лу Л.Л., Жу Е., Гупта Д.К., Ислам Е., Янг Х.Е. Антиоксидантная система в корнях двух контрастных экотипов *Sedum alfredii* при повышенных концентрациях цинка // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 6 С. 886 – 894.
7. Beligni M.V., Lamattina L. Nitric Oxide Interferes with Plant Photo-Oxidative Stress by Detoxifying Reactive-Oxygen Species // Plant Cell Environ. 2002. V. 25. P. 737 – 748.
8. Красиленко Ю.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. Функциональная роль оксида азота у растений // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 483 – 494.
9. Zhang Y.Y., Liu J., Liu Y.L. Nitric Oxide Alleviates Growth Inhibition of Maize Seedlings under NaCl Stress // Nitric Oxide. 2004. V. 30. P. 455 – 459.
10. Хайят Ш., Ядав С., Али Б., Ахмад А. Взаимодействие оксида азота и брассиностероидов при их влиянии на фотосинтез и антиоксидантную систему томата // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 2. С. 224 – 233.
11. Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C., Lamattina L. Nitric Oxide Mediates the Expression of Cell-Cycle Regulatory Genes during Lateral Root Formation in Tomato // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 581 – 588.
12. Чжан Х., Ли Я.Х., Ху Л.Ю., Ван С.Х., Чжан Ф.К., Ху К.Д. Влияние обработки листьев пшеницы донором окиси азота на антиокислительный метаболизм при стрессе, вызванном алюминием // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 4. С. 523 – 528.
13. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Влияние нитропруссиды натрия на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // Вісник Харківського національного аграрного університету Серія Біологія. 2011. Т. 58. № 6. С. 883 – 890.
14. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1973. 595 с.
15. Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений: Учебник. – М.: Логос, 2001. – 224 с.
16. Кожевникова А.Д., Серегин И.В., Быстрова Е.И., Беляева А.И., Катаева М.Н., Иванов В.Б. Влияние нитратов свинца, никеля и стронция на деление и растяжение клеток корня кукурузы // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 268 – 277.
17. Коруга М., Gwozdz E. Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and Counteracts the Inhibitory Effect of Heavy Metals and Salinity of Root Growth of *Lupinus luteus* // Plant Physiol. Biochem. 2003. V. 41. P. 1011 – 1017.
18. Wang Y.-S., Yang Z.-M. Nitric Oxide Reduces Aluminum Toxicity by Preventing Oxidative Stress in the Roots of *Cassia tora* L. // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. P. 1915 – 1923.

УДК 68.03.07

АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ И ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИЕ РИЗОСФЕРНЫЕ БАКТЕРИИ ЯЧМЕНЯ И ПШЕНИЦЫ

Сафронова Г. В.¹, Мельникова Н. В.¹, Алещенкова З. М.¹, Есенбаева А.Е. ²,
Тен О.А.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

²Филиал РГП «Национальный центр биотехнологии», Республика Казахстан

Введение

Одним из актуальных направлений развития экологического земледелия является создание микробных биотехнологий, способствующих интенсификации сельскохозяйственного производства и сохранению плодородия почв. Для современной системы земледелия большое значение имеют микробиологические факторы, использование которых дает возможность существенно повысить плодородие почвы и степень реализации генетического потенциала культурных растений.

Обязательным компонентом любого агрофитоценоза, где между растениями и микроорганизмами осуществляются молекулярные взаимодействия, суть которых заключается в обмене метаболитами и их трансформации, является почвенная микрофлора. Почвенные микроорганизмы способствуют формированию в ризосферной зоне фонда доступных растению питательных веществ и физиологически активных соединений, регулирующих метаболизм и взаимоотношения между партнерами. Очевидно, что спектр механизмов взаимодействия партнеров агрофитоценоза находится под влиянием различных экологических факторов и может эффективно осуществляться при оптимальных условиях.

Разнообразие природных форм почвенных микроорганизмов позволяет выделять новые штаммы с агрономически-полезными свойствами, адаптированные к корневым выделениям тех или иных сельскохозяйственных растений, неприхотливые к условиям существования, с высокой активностью роста, за счет чего они способны легко адаптироваться к росту и развитию в ризосфере культурных растений [1–3]. Поиск и выделение из разных почв и ризосферы растений методом аналитической селекции новых штаммов микроорганизмов, характеризующихся хозяйственно-ценными свойствами, и создание на их основе бактериальных препаратов под зерновые, бобовые и технические культуры является актуальным направлением сельскохозяйственной биотехнологии.

Цель исследований – выделить и отселектировать штаммы ростстимулирующих азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий, перспективных для получения комплексного биоудобрения для зерновых культур. Для ее достижения были поставлены и решались следующие задачи:

- отобрать из ризосферы зерновых культур штаммы азотфиксирующих ризобактерий;
- отобрать из ризосферы зерновых культур штаммы фосфатсольмобилизующих ризобактерий.

Материалы и методы исследований

Микробиологические объекты:

- 34 изолята олигонитрофильных микроорганизмов, выделенные из ризосферы ячменя и пшеницы, возделываемых в Республике Беларусь;

- 15 изолятов фосфатмобилизующих микроорганизмов, выделенные из ризосферы ячменя и пшеницы, возделываемых в Республике Беларусь.

Почвенные объекты:

- образцы ризосферной почвы и ризосферы ячменя сорта Сябра и пшеницы сорта Иволга для выделения олигонитрофильных и фосфатмобилизующих микроорганизмов, отбирали однократно в августе 2012 г. с глубины почвы 10-20 см вместе с растениями в соответствии с руководством [4].

Изоляты олигонитрофильных микроорганизмов из ризосферы ячменя и пшеницы выделяли на твердых питательных средах Эшби [5] и безазотной среде Bürka [6].

Нитрогеназную активность изолятов олигонитрофильных микроорганизмов, а также нитрогеназную активность в ассоциации с растениями определяли ацетиленовым методом на газовом Хром-4, модернизированном аппаратно-программным комплексом UniChrom 4.x-5 [7].

Выделение микроорганизмов, растворяющих фосфаты кальция, и определение способности чистых культур выделенных изолятов трансформировать малоподвижные Са-Р, Al-Р и Fe-Р проводили методом осаждения фосфатов кальция, алюминия или железа в агаризованную глюкозо-аспарагиновую среду [8]. Фосфатсолубилизующими считали микроорганизмы, образующие зоны «гало» вокруг колоний.

Чистоту изолятов проверяли методами люминесцентной микроскопии и посевом последовательных разведений суспензии на соответствующие агаризованные питательные среды [4].

Изоляты выделенных микроорганизмов поддерживались на агаризованной питательной среде мясо-сушлом агаре [9]. Для сохранения и поддержания хозяйственно-ценных свойств изоляты олигонитрофильных микроорганизмов пересеивали также на среду Эшби, фосфатмобилизующих – на агаризованную глюкозо-аспарагиновую среду (среду Муромцева) [8].

Результаты исследований и их анализ

Выделение изолятов азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий проводили из накопительных культур ризосферной почвы ячменя и пшеницы, культивируемой на соответствующих элективных средах.

Из числа доминирующих колоний олигонитрофильных микроорганизмов, хорошо растущих на безазотистых средах Эшби и Bürka без внесения витаминов и стартовых доз азота, отобраны 34 изолята. По морфологическим и некоторым физиолого-биохимическим признакам их условно разделили на несколько групп, которые можно характеризовать следующим образом:

I группа. Палочки, грамотрицательные, неспорообразующие, оксидаза-отрицательные, каталаза-положительное, аэробные и факультативно анаэробные отнесены к сем. *Enterobacteriaceae* (штаммы 3–5, 7MS, 9, 11–14, 15MS, 17, 22, 32, 34).

II группа. Палочки, грамотрицательные, неспорообразующие, оксидаза- и каталаза-положительные, аэробные отнесены к сем. *Pseudomonadaceae* (штаммы 1, 6, 10MS, 18–20, 23, 30).

III группа. Палочки, грамположительные, спорообразующие, ката-лазоположительные, факультативно-анаэробные отнесены к сем. *Bacillaceae* (штаммы 16, 21, 27–29).

Систематическое положение штаммов 2MS, 8MS, 24–26, 31 и 33, представляющих собой грамотрицательные палочки, неясно.

Анализируя результаты систематической принадлежности микроорганизмов, можно считать, что среди бактерий ризосферы ячменя и пшеницы, способных расти без стартовых доз азота, преобладают грамотрицательные палочки; около 40% из них являются представителями семейства *Enterobacteriaceae*.

В соответствии с задачами наших исследований основное внимание должно быть уделено штаммам, которые могут оказать позитивное влияние на рост растений при инокуляции их в ризосферу. При подборе таких штаммов важное свойство – азотфиксация, показателем которой является нитрогеназная активность.

Проведена селекция 34 выделенных изолятов олигонитрофилов по признаку биологической фиксации атмосферного азота в чистой культуре. Установлена способность к фиксации азота атмосферы у 20 ризобактерий (табл. 1), т.е. не все выделенные изоляты микроорганизмов, несмотря на их хороший рост на безазотистых средах Эшби и Вюрка, обладают способностью к азотфиксации. Среди представителей сем. *Bacillaceae* не было ни одного штамма с положительной ацетиленредуктазной активностью, хотя в литературе имеются сообщения о фиксации азота этой группой бактерий. Возможно, для проявления нитрогеназной активности бациллами необходимы другие условия культивирования.

Среди микроорганизмов, принадлежащих к остальным систематическим группам, выявлены азотфиксаторы с различной степенью нитрогеназной активности: от 0.04 до 15.52 мкг азота/фл./сут. По этому признаку бактерии, можно условно разделить на 3 группы: 1) штаммы с высокой (7MS, 15MS, 10MS, 2MS, 8MS), 2) средней (5, 9, 22, 24, 25, 32) и 3) низкой активностью (4, 11, 14, 6, 26, 31). Максимальная НГ-активность выявлена у выделенных изолятов 7MS, 15MS, 10MS, 2MS и 8MS. Их средние значения составляли 2.28, 15.52, 1.56, 2.76 и 1.64 мкг азота/фл./сут соответственно.

В связи с тем, что фиксация азота в чистых культурах не может служить абсолютным доказательством азотфиксирующей активности бактерий, поставлен стерильный микровегетационный опыт и определена ацетиленредуктазная активность выделенных штаммов в ассоциации с растением. Из полученных результатов следует, что штаммы 7MS и 10MS в ассоциации с растениями ячменя фиксируют 105.1 и 28.4 нМ C_2H_4 /раст./ч, штаммы 15MS, 2MS и 8MS в ассоциации с растениями пшеницы – 154.6, 30.4 и 42.5 нМ C_2H_4 /раст./ч соответственно. Таким образом, выявлено, что 5 отобранных штаммов обладают способностью фиксировать азот в ассоциации с растением, хотя степень их активности различна и не всегда согласуется с активностью, зафиксированной в опыте с чистыми культурами. Наиболее активными азотфиксаторами являются штаммы 7MS и 15MS, относящиеся к сем. *Enterobacteriaceae*.

Вторая группа микроорганизмов, выделенная из ризосферы зерновых культур – фосфатмобилизующие бактерии. Выделение и селекцию фосфатсольбилизирующих бактерий проводили чашечным методом на агаризованной среде, содержащей в качестве источника минерального фосфата ортофосфат кальция, т.к. многие почвы Беларуси имеют близкую к нейтральной реакцию среды ($pH \approx 6.6$). Всего в чистую культуру изолировали 15 изолятов, которые на 2-е сутки культивирования формировали четкие зоны просветления агара (рисунок 1, таблица 1). Диаметр зон «галло» вокруг колоний этих штаммов достигал 3–10 мм.



Рис. 1. Растворение фосфатов кальция ризосферной фосфатмобилизующей микрофлорой (1), фосфатов железа (2) и кальция (3) штаммом 35MS, выделенным из ризосферы пшеницы.

Два штамма 4MS (ячмень) и 35MS (пшеница) растворяли фосфат кальция наиболее активно (6,4 и 10,1 мм соответственно), поэтому далее была исследована их способность растворять фосфаты алюминия и железа. Установлено, что чистая культура фосфатмобилизующих бактерий 35MS трансформировала и труднорастворимые фосфаты железа (таблица 1).

Таблица 1.

Растворение фосфатов кальция фосфатсольюбилизирующими ризобактериями.

Вариант опыта	Диаметр зон растворения фосфатов, мм			Вариант опыта	Диаметр зон растворения фосфатов, мм			
	кальция	железа	алюминия		кальция	железа	алюминия	
ячмень	1	4.8±0.18		пшеница	24	8.2±0.36		
	2	3.8±0.13			26	8.5±0.31		
	4MS	6.4±0.26	–		27	5.3±0.22		
	5	4.4±0.21			30	4.9±0.22		
	8	5.3±0.19			32	4.8±0.18		
	10	5.2±0.22			33	5.0±0.22		
	11	3.4±0.19			35MS	10.1±0.48	10.0±0.47	–
	14	6.1±0.28						

Заключение

Таким образом, из ризосферы ячменя и пшеницы, возделываемых в Республике Беларусь, выделены 34 изолята олигонитрофильных и 15 изолятов фосфатмобилизующих микроорганизмов.

По признаку биологической фиксации атмосферного азота в чистой культуре из 34 изолятов отобраны 20 азотфиксирующих штаммов, 40% которых принадлежат к сем. *Enterobacteriaceae*. Максимальная нитрогеназная активность, как в чистой культуре, так и в ассоциации с растениями выявлена у штамма 15MS.

Все выделенные фосфатмобилизующие бактерии трансформировали ортофосфаты кальция. Диаметр зон «галло» вокруг колоний этих штаммов достигал 3–10 мм.

Наиболее активные штаммы азотфиксирующих (7MS, 15MS) и фосфатмобилизующих (4MS, 35MS) ризобактерий могут быть перспективны для повышения азотфиксирующего и фосфатмобилизующего потенциала растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова Т. Н., Веселов С. Ю., Мелентьев А. И., Мартыненко Е. В., Кудоярова Г. Р. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 4. С. 567–574.
2. Волкогон В. В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы // Микробиол. журн. 2000. Т. 62. № 2. С. 51–68.
3. Khan M. S., Zaidi A., Wani P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture // A review. Agron. Sustain. Dev. 2007. V. 27. P. 29–43.
4. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М.: ООО «ДРОФА». 2004. – 256 с.
5. Звягинцев Д. Г., Асеева И. В., Бабьева И. П., Мирчинк Т. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ. 1980. – 223 с.
6. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. М.: Мир. 1983. Т. 2. – 470 с.
7. Умаров М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях // Почвоведение. 1976. № 11. С. 119–123.
8. Некоторые новые методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств: Метод. рекомендации / Всесоюз. науч.-исслед. ин-т с.-х. микробиол. Л. 1987. 53 с.
9. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. Минск: Колас. 1983. 296 с.

УДК 631.8:633.11 «321»

**БИОПРЕПАРАТЫ И БИОАКТИВИРОВАННЫЕ УДОБРЕНИЯ
НА ПОСЕВАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ**

Сергеев В.С., Дмитриев А.М.

Башкирский государственный аграрный университет, г. Уфа, Россия

В современных условиях актуальной задачей земледельца является получение экологически качественной и безопасной продукции растениеводства. При ее решении возрастает роль биопрепаратов и биоактивированных комплексных удобрений с макро- и микроэлементами. Их использование позволяет значительно снизить затраты на химические средства защиты растений и удобрений, повысить устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов, достичь антистрессовой компенсации угнетающего действия пестицидов на культурные растения, а также улучшить экологическую обстановку в агроценозах [1-5].

Исследования проводились на опытных полях Учебного научного центра ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ в условиях Предуралья Республики Башкортостан.

Почва опытного участка – чернозем выщелоченный среднесиловой среднегумусный тяжелосуглинистый на делювиальном карбонатном суглинке. Агрохимические показатели почвы: содержание гумуса – $9,0 \pm 0,02\%$; валового азота – $0,46 \pm 0,01\%$; фос-

фора – $0,17 \pm 0,01\%$; калия – $1,4 \pm 0,03\%$; минерального азота ($N-NH_4+N-NO_3$) – 11 ± 3 мг/кг; подвижного фосфора – 52 ± 3 мг/кг; обменного калия – 145 ± 7 мг/кг почвы; сумма поглощенных оснований – $39,1 \pm 0,3$ мг-экв. на 100 г почвы; pH_{KCl} – $5,3 \pm 0,1$.

Схема опыта представлена в таблице 1. Площадь делянки – 108 м². Повторность – трехкратная, расположение делянок – последовательное.

Таблица 1

Схема опыта

Вар-т	Обработка семян	Обработка вегетирующих растений в фазу кущения
А	Без обработки	Без обработки
Б	Тебутин (0,5 л/т)	Дикамба (0,3 л/га)
В	Фитоспорин М Экстра (1,0 л/т)	Дикамба (0,3 л/га)
Г	Тебутин (0,25 л/т)+ Фитоспорин М Экстра (1,0 л/т)+Гуми 20 М (0,2 л/т)	Дикамба (0,3л/га)+Фитоспорин М (1,0 л/га)+ Богатый NPK 5:6:9+МЭ (1,0 л/га) + Бионекс-Кеми NPK+Mg 40:0:0+0,7 (3,0 кг/га)

В опыте выращивали сорт яровой пшеницы Ватан с нормой высева 5,5 млн. всхожих семян на 1 га. Предшественник – горох. Сложно-смешанные удобрения в дозе N15P15K15 (в д.в.) вносили в рядки при посеве. Для предпосевной обработки семян и регулирования численности сорных растений на посевах яровой пшеницы использовали разрешенные пестициды.

Биопрепараты и биоактивированные удобрения применяли, как отдельно, так и в баковых смесях с пестицидами, используя машины для протравливания семян и штанговые опрыскиватели по вегетации растений при расходе рабочей жидкости 10 л/т и 250 л/га соответственно [6]. В остальном агротехника возделывания культуры строилась в соответствии с существующими зональными рекомендациями.

Агрометеорологические условия в годы проведения исследований характеризовались резкими колебаниями температуры воздуха, неустойчивым увлажнением по годам и неравномерным распределением осадков в течение периода вегетации яровой пшеницы. В начале вегетации 2012 г. были суховеи, наблюдалась почвенная засуха, ГТК составил 0,6. Более увлажненным был 2013 г. при показателе ГТК за вегетационный период - 0,8.

Применяемые пестициды, биопрепараты и биоактивированные удобрения на посевах яровой пшеницы способствовали повышению сохранности и продуктивной кустистости растений, увеличению количество зерен в колосе и его массы в сравнении с контролем (таблица 2). Наилучшие показатели структуры урожая отмечены при использовании химпротравителя Тебутин в половинной от рекомендуемой дозе в комплексе с биофунгицидом Фитоспорин М Экстра и регулятором роста растений Гуми 20М с последующей обработкой посевов в фазе кущения гербицидом Дикамба в сочетании с биофунгицидом и биоактивированными удобрениями (вариант Г). В среднем за два года густота стояния растений составила 350 шт./м², продуктивная кустистость повысилась до 1,15, масса 1000 зерен - до 29,2 г.

Таблица 2

Влияние пестицидов, биопрепаратов и биоактивированных удобрений на структуру
урожая яровой пшеницы

Вариант	Кол-во растений, шт./м ²		Продуктивная кустистость		Кол-во зерен в колосе, шт.		Масса 1000 зерен	
	2012г.	2013г.	2012г.	2013г.	2012г.	2013г.	2012г.	2013г.
А	334	318	1,16	1,04	13,4	14,2	28,0	26,1
Б	346	335	1,18	1,06	13,2	15,4	28,6	27,1
В	336	322	1,17	1,03	13,6	14,4	28,2	26,6
Г	352	347	1,25	1,05	14,3	16,6	29,1	29,3

Наибольшая эффективность против возбудителей корневых гнилей, также, отмечена при использовании для обработки семян баковых смесей биологических и химических (в половинной дозе) пестицидов. Распространенность и интенсивность развития возбудителей корневых гнилей в посевах при этом снизилась, по сравнению с контролем, в среднем на 41 и 16% соответственно, что, несомненно, сказалось на урожайности культуры. Так, при использовании только химических средств защиты растений (вариант Б) прибавка к контролю в среднем за два года составила 0,18 т/га, в то время как совместное применение их с биопрепаратами и биоактивированными удобрениями способствовало увеличению урожайности на 0,47 т/га (таблица 3).

Таблица 3

Урожайность, распространенность и интенсивность развития корневых гнилей на посевах яровой пшеницы

Вариант	Распространенность/интенсивность развития корневых гнилей, %		Урожайность, т/га					
			годы				в среднем за 2 года	±
	2012г.	2013г.	2012г.	±	2013г.	±		
А	80,0/27,5	62,1/26,2	1,45	-	1,22	-	1,33	-
Б	47,2/13,9	38,9/11,2	1,54	0,09	1,48	0,26	1,51	0,18
В	58,3/21,0	37,1/15,8	1,51	0,06	1,27	0,05	1,39	0,06
Г	50,0/12,5	34,2/10,6	1,83	0,38	1,77	0,55	1,80	0,47
НСР ₀₅			0,03		0,04			

Важнейшими хозяйственно-биологическими признаками яровой пшеницы являются количество и качество клейковины, а также содержание белка в зерне. В опытах отмечено, что применение биопрепаратов и биоактивированных удобрений в наибольшей степени способствовало повышению массовой доли клейковины (вариант Г). Здесь же отмечено и увеличение содержания белка в зерне яровой пшеницы. Стекловидность по вариантам опыта варьировала незначительно (таблица 4).

Таблица 4

Показатели качества зерна яровой пшеницы (2012-2013 гг.)

Вариант	Массовая доля клейковины, %		Стекловидность, %		Белок, %	
	2012г.	2013г.	2012г.	2013г.	2012г.	2013г.
А	31,2	26,5	64	52	16,0	15,8
Б	31,8	27,4	63	53	16,1	16,4
В	32,0	27,2	63	53	16,0	16,1
Г	32,7	27,8	64	55	16,5	16,7

Таким образом, обработка семян препаратами серии Гуми и Фитоспорин-М не заменяет, а дополняет существующую систему защиты растений путем повышения всхожести и ускорения стартового развития, нейтрализации частичного токсического эффекта химпротравителя и проявления адаптивных возможностей растений при влиянии любых неблагоприятных факторов биотического и абиотического характера. Использование биопрепаратов и биоактивированных удобрений во время химпрополки посевов яровой пшеницы повышает иммунный статус растений, снижает фитотоксичность гербицида, способствует к более быстрому преодолению «гербицидной ямы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Завалин, А. А. Применение биопрепаратов при возделывании полевых культур [Текст] / А. А. Завалин // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 8. – С. 9-11.
2. Кузнецов, В. И. Антистрессовое высокоурожайное земледелие (АВЗ) - биотехнология выращивания сельскохозяйственных культур, как инновационная основа современного земледелия [Текст] / В. И. Кузнецов, Ю. М. Шаульский, Ш. Я. Гилязетдинов // Достижение науки и техники. – 2011. – № 5. – С. 17-19.
3. Петров, В. Б. Микробиологические препараты – базовый элемент современных интенсивных агротехнологий растениеводства [Текст] / В. Б. Петров, В. К. Чеботарь // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 8. – С. 11-15.
4. Сергеев В.С.,. Применение антистрессовых препаратов на посевах яровой пшеницы с целью повышения устойчивости к фитопатогенам и урожайности культуры [Текст] / Р.Ф.Исаев, Г.Н Полякова, О.В. Радцева, Г.М. Рахимова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. – № 12. – С. 430-431.
5. Сергеев, В. С. Антистрессовая технология защиты сельскохозяйственных культур [Текст] / В. С. Сергеев // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. – № 10. – С. 33-36.
6. Хасанов Э. Р., Совершенствование режимов работы инкрустатора семян путем определения зон взаимодействия воздушных потоков [Текст] / Э. Р. Хасанов, Р. В. Ганеев // Известия Международной академии аграрного образования. – 2013. – № 17. – С. 126-130.

УДК 635.21:632.4

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ФИТОФТОРОЗУ

Сорокань А.В., Веселова С.В., Максимов И.В.

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра
Российской академии наук

Этилен – газообразный фитогормон, регулирующий процессы старения и созревания растений, благодаря чему он нашел широкое применение в сельском хозяйстве, в особенности в области хранения [Arshad, Frankenberger, 2002]. К сожалению, данные о влиянии этилена в развитии или подавлении защитных реакций против болезней весьма противоречивы. С одной стороны, патогены, вызывающие гниль клубней, в том числе из рода *Phytophthora*, способны вызывать в растениях стимуляцию синтеза этилена. Некоторые исследователи считают, что таким образом патоген может активнее колонизировать инфицированные органы [Arshad, Frankenberger, 2002]. Однако, известны и данные о том, что, например, предварительная обработка этиленом растений сои способствовала увеличению устойчивости к *Phytophthorasojae* [Sugano et al., 2013]. Таким образом, исследование роли этилена в регуляции устойчивости растений к патогенам имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Нами была поставлена цель определить как будут отвечать растения картофеля на инфицирование возбудителем фитофтороза в условиях воздействия на них этефона (предшественник этилена) и метилциклопропеновой (МЦП) кислоты (ингибитор рецепции этилена).

Пробиорочные стерильные растения сорта Ранняя Роза после 30 суток культивирования на среде Муросиге-Скуга обрабатывали растворами этефона и МЦП в концентрации 0,1 г/л из расчета 300 мкл на каждое растение. Через 24 часа растения инфицировали путем нанесения на каждый лист по 5 мкл суспензии зооспор (10^5 спор/мл) возбудителя фитофтороза. Развитие симптомов болезни наблюдали в течение 7 сут после инфицирования. Об интенсивности развития заболевания судили по соотношению площади поражения к общей площади листа, расчет производили в программе ImageJ (NationalInstitutesofHealth).

Растительные экстракты, содержащие свободно-растворимую фракцию белков получали согласно [Bireska и Miller, 1974]. Активность пероксидазы измеряли микрометодом [Хайруллин и др., 2001]. Концентрацию пероксида водорода измеряли с использованием красителя ксиленоловыйоранжевый [Bindschelder et al., 2001]. Оптическую плотность измеряли на приборе BenchmarkMikroplateReader ("BioRad", США) при 490 нм. Для цитохимического выявления активности пероксидаз использовали раствор диаминобензидина (ДАБ), фотодокументирование проводили с использованием микроскопа AxioImager M1 ("CarlZeiss", Германия).

Нами не обнаружено достоверных различий в развитии симптомов фитофтороза между контролем и вариантом обработки листьев этефоном (рис. 1). В то же время ингибитор рецепции этилена МЦП снижал площадь поражения практически более чем в 2 раза.

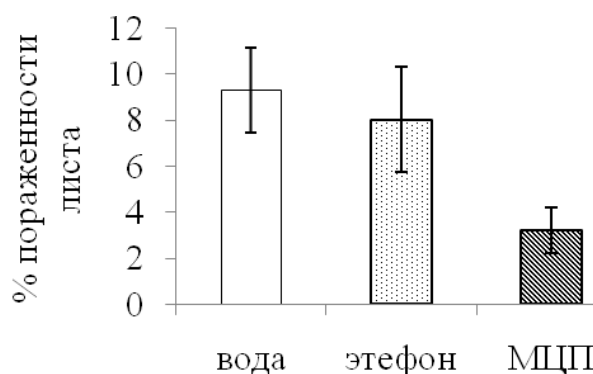


Рис. 1. Влияние препаратов этефон и МЦП на развитие симптомов фитофтороза на листьях пробирочных растений картофеля на 7 сутки после инфицирования спорами возбудителя фитофтороза.

Пероксид водорода важное соединение, вовлеченное во многие процессы, связанные с защитным ответом. Анализ влияния этефона и МЦП на ее содержание в растениях картофеля в норме и при инфицировании возбудителем фитофтороза показал, что этефон увеличивал содержание этого соединения в неинфицированных растениях, что согласуется с данными [Poore, Tari, 2011]. Интересно, что МЦП стимулировал генерацию H_2O_2 в неинфицированных растениях к 3 сут. В то же время в инфицированных растениях обработанных этефоном заметного подъема уровня перекиси водорода на протяжении всего опыта не наблюдалось. Тогда как МЦП приводил к накоплению перекиси водорода к 3 сут. более чем в 5 раз.

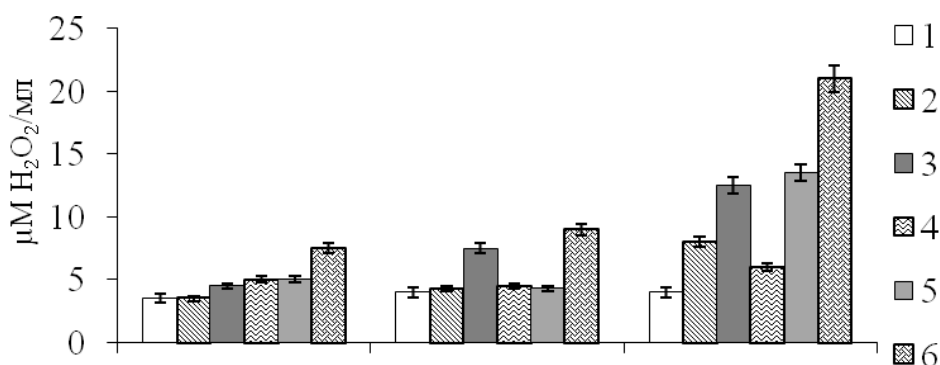


Рис. 2. Влияние этефона и МЦП на содержание перекиси водорода в растениях картофеля в норме и при инфицировании *P. infestans*: 1 - контроль; 2 - контроль+ *P. infestans*; 3 - этефон; 4 - этефон + *P. infestans*; 5 - МЦП; 6 - МЦП + *P. infestans*.

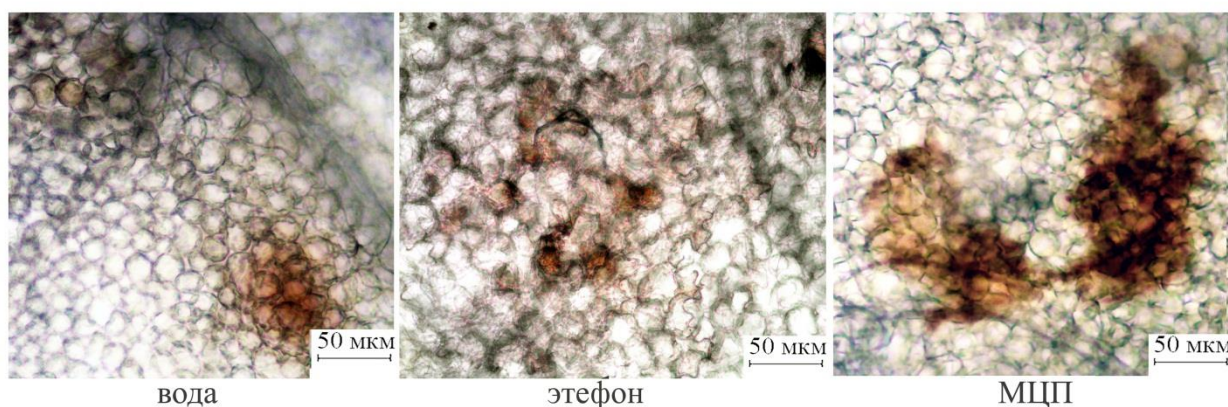


Рис. 3. Активность пероксидаз в клеточных стенках инфицированных листьев картофеля, обработанных этефоном и МЦП.

Ранее нами показано, что в инфицированных растениях картофеля, обработанных индуцирующими соединениями (салициловая и жасмоновая кислоты), происходило увеличение пероксидазной активности, и это сопровождалось снижением симптомов заболевания [Максимов и др., 2011]. При этом, одним из важных показателей формирования защитных реакций растений является концентрирование этого фермента в зоне инфицирования. Ранее мы показали, что концентрирование пероксидаз в зоне внедрения патогена может иметь решающее значение в развитии устойчивости картофеля к фитофторозу [Сорокань и др., 2014]. В соответствии с этим мы исследовали, как влияют этефон и МЦП на локализацию пероксидаз в местах инфицирования возбудителем фитофтороза. Как видно, площадь с высоким уровнем активности пероксидаз в контрольных растениях локализована на участке около 50 мкм от точки инфицирования. В то же время, под влиянием этефона число окрашенных клеток ДАБ возрастает, но они окрашены заметно меньше, чем даже таковые клетки контроля. Тогда как при обработке МЦП наблюдаются плотные интенсивно окрашенные участки, превышающие размер контрольных.

Таким образом, прерывание этиленового сигналинга под влиянием ингибитора рецепторов этилена МЦП приводило к увеличению содержания перекиси водорода и локальной активности пероксидаз в местах инфицирования листьев. Вероятно, эти изменения в последствии способствовали развитию устойчивости растений к возбудителю фитофтороза. Интересно, что экзогенный этилен, увеличивая содержание перекиси водорода в неинфицированных растениях, не приводил к заметному изменению устойчивости. Можно предположить, что при блокировании этиленового сигнала растение становится более чувствительным к выделяемым патогенами элиситорам, либо при этом изменяется баланс фитогормонов, таких, как салициловая и жасмоновая кислоты, что позволяет растению эффективнее запускать защитные системы. В то же время, данные о снижении содержания пероксида водорода в инфицированных растениях, подвергнутых воздействию этефона предполагают наличие у патогена неких веществ-эффекторов, работа которых наиболее активно происходит в условиях генерации этилена.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» Министерства образования и науки Российской Федерации (Госконтракт П-339) и РФФИ-Поволжье 14-04-00903 на оборудовании ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимов И.В., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сурина О.Б., Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про-/антиоксидантной системы картофеля при фитофторозе // Физиология растений. 2011. Т. 57. № 2. 299 - 306.
2. Сорокань А. В., Кулуев Б. Р., Бурханова Г. Ф., Максимов И. В. Рнк-сайленсинг гена анионной пероксидазы приводит к снижению устойчивости картофеля к *Phytophthora infestans* Mont. De Bary // Молекулярная биология. 2014. Т.48.№ 5.с. 1–10.
- Arshad M., Frankenberger W.T. Ethylene: agricultural sources and applications. 2002. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers. 342 pp.
3. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signaling events in the apoplastoxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // New Phytol. 2001. V. 151. P. 185–194.
4. Mellersh D.G., Foulds I.V., Higgins V.J., Heath M.C. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions // Plant J. 2002. V. 29. P. 257–268.
5. Poór P., Tari I. Ethylene-regulated reactive oxygen species and nitric oxide under salt stress in tomato cell suspension culture // Acta Biologica Szegediensis. V. 55(1). P. 143–146.
6. Sugano S., Sugimoto T., Takatsuji H., Jiang C.-J. Induction of resistance to *Phytophthora sojae* in soybean (*Glycine max*) by salicylic acid and ethylene // Plant Pathology. 2013. V. 62. P. 1048–1056.

УДК 577.15.

ВЛИЯНИЕ ФИТОПРЕПАРАТА НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА КАТАЛАЗЫ И ПЕЙЗАЖА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ У МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. В ПЕРИОД ИХ ЗИМОВКИ

Фархутдинов Р.Г.,¹ Шелехов Д.В., Шафикова В.М.,¹ Прядко А.Н., Тукумбетова Г.Г.

Башкирский государственный университет, г. Уфа

¹Башкирский государственный аграрный университет, г. Уфа, Россия

Благополучие зимовки пчел зависит от многих факторов: зимостойкости пчел, формирования гнезда, количества и качества корма, условий зимовки, подготовки пчел, ухода за пчелами, состояния их здоровья и т. п. [1]. Применение препаратов, включающих в своей основе природные компоненты поможет избежать многих побочных эффектов, так как механизмы их действия существенно отличаются и основаны, прежде всего, на активации естественных защитных реакций организма [7].

Уменьшить ослабление семей и улучшить качество зимовки помогает осеннее наращивание пчелиной семьи, в комплексе мер применяемых для этих целей, исполь-

зуют сахарные подкормками обычно с различными стимулирующими добавками. В последние годы все отчетливее проявляется тенденция использования препаратов природного происхождения. В пчеловодстве это особенно актуально, так как продукты пчеловодства должны соответствовать всем требованиям экологической безопасности.

Целью исследований было определить влияние растительного препарата «Фитоаск» на изменение активности фермента каталазы как показателя зимостойкости пчел и видоизменения в составе энтерофлоры кишечника пчелы в период зимовки. Ранее нами было показано, что при применении фитопрепарата через 2 месяца повышалась активность фермента пероксидаза и каталаза, а также содержание минеральных веществ, углеводов и липидов в теле пчел [8]. Нам представилось интересным изучить, как изменяется активность фермента каталазы и как изменяется видовой состав в течение зимовки пчел.

Каталаза - фермент, разлагающий перекись водорода с выделением молекулярного кислорода. Предохраняет организм от токсического действия перекиси водорода и является источником молекулярного кислорода в тканях. Существует определенная зависимость между степенью наполнения кишки и активностью каталазы ректальных желез. Этот фермент имеет двойное происхождение: выделяется ректальными железами и различными микроорганизмами, находящимися в кишечнике. Выделение этого фермента можно рассматривать как определенное физиологическое приспособление, направленное на ликвидацию вредных последствий, которые могут возникнуть при сильном наполнении прямой кишки пчелы [1]. Поэтому, чем выше показатель активности этого фермента, тем меньше будет сказываться отрицательное действие перекиси водорода, а клетки тканей не будут испытывать дефицита в кислороде.

В качестве контроля пчелиные семьи получали сахарный сироп (1:1) без добавок. Анализ активности фермента проводили перманганатометрическим методом, данные выражали в (мкмоль/мин/мг) [11]. опыты проводились на 10 пчелиных семьях, 2 аналогичные группы по 5 семей в каждой. Группы пчелиных семей подбирались методом пар – аналогов с учетом следующих показателей: сила пчелиных семей, количество печатного расплода и корма. В конце августа на основе настоя сбора «Фитоаск» готовился сахарный сироп. В состав сбора лекарственных трав входит: трава вероники, лабазника, эхинацеи, хвоща, чабреца, чистотела, лист березы, эвкалипта, цветки календулы, бессмертника, хвоя ели, кора осины, слоевища исландского мха, чесночное масло. По фармакологическому действию сбор обладает фунгицидными и стимулирующими свойствами. Подкормка разливалась по кормушкам по 1 л на пчелосемью дважды через семь дней. Контрольной группе давали чистый сироп в таком же количестве.

Для оценки стимулирующего влияния подкормок на зимовку пчел, в начале октября, в феврале (начало яйцеклада маткой) и в апреле (перед выставкой пчел на облёт) мы отбирали живых пчел для определения активности ферментов каталазы и видового состава энтеробактерий в кишечнике пчел.

Как известно из литературы [12], активность фермента ректальных желез сильно зависит от сезона года и неодинаковы у различных групп пчел. Нами было установлено, что активность каталазы в октябре месяце у опытной группы составила $246,18 \pm 8,1$, в феврале $185,46 \pm 10,3$ и в апреле $98,13 \pm 12,14$ мкмоль/мин/мг. В контрольной группе соответственно составил в октябре – $187,44 \pm 12,2$ в феврале $88,23 \pm 14$ и апреле $51,12 \pm 7,3$ мкмоль/мин/мг.

Таким образом, показатель активности ректальных желез у пчел получавших препарат был выше в течение всей зимовки пчел. Под действием растительного сти-

мулятора возрастала активность фермента каталазы, что свидетельствует о лучшей подготовке пищеварительной системы пчел к зимовке.

Известно, что в состав микрофлоры медоносных пчел могут входить микроорганизмы различных физиологических групп, выполняющие определенные функции [9]. В.И. Полтевым с сотр. составлен перечень микроорганизмов, обнаруживаемых у пчел, в том числе и в кишечнике [3]. Можно предположить, что нормальная кишечная микрофлора пчел определяет состояние пчелиной семьи [10]. Однако до сих пор вопрос о нормальной микрофлоре пчел остается открытым, несмотря на широкий спектр микроорганизмов, обнаруживаемых в пчелиных семьях. Нами ранее было показано, какую важную роль играет окружающая среда в миграции спор *Ascoseira apis* на территории продуктивного лета пчел [5].

У зимующих пчел, как известно из литературы, состав энтерофлоры достаточно беден по сравнению с летним пейзажем и включал в себя представителей 6 родов семейства *Enterobacteriaceae* [2,9,10]. Известно, что чем больше в кишечном тракте пчел энтеробактерий, тем ниже оценивалось состояние кишечника и чем больше было лактобактерий, тем выше состояние кишечника [4].

Нам, на данном этапе исследований, удалось установить наличие октябре месяце в содержимом кишечника пчел получавших сахарный сироп представителей - *Candida krusei*, *Staphylococcus epidermidis*, непатогенные энтеробактерии - *Escherichia coli*. В кишечнике пчел которые получали с сахарным сиропом настоей лекарственных трав установлено наличие *Candida krusei*, *Staphylococcus saprophyticus*, непатогенные энтеробактерии - *Escherichia coli*. В последнем варианте отсутствовали представители плесневых грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*, что вероятно связано с антимикотической активностью сбора [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Жеребкин М.В. Зимовка пчел. – М.: Россельхозиздат, 1979. – 151 с.
2. Ляпунов Я.Э., Кузьев Р.З., Хисматуллин Р.Г., Безгодова О.А. Энтеробактерии кишечника зимующих пчел *Apis mellifera mellifera* L. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 3. С. 421–428.
3. Микрофлора насекомых / Под. ред. В.И. Полтева, И.Н. Гриценко, А.И. Егоровой и др. Новосибирск: Наука, СО АН СССР, 1969. 271 с.
4. Сердюченко И.В. Микробиоценоз кишечного тракта медоносных пчел и его коррекция. автореф.... канд. вет. наук. Краснодар, 2013. 20 с.
5. Туктарова Ю.В. Фархутдинов Р.Г. Особенности миграции спор *Ascoseira apis* на территории продуктивного лета пчел. // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. - 2013, № 1 (9), С. 55-58
6. Фархутдинов Р.Г., Лукьянцев М. А., Туктарова Ю. В., Шафикова В. М. Исследование фунгицидных свойств лекарственных растений и применение фитосбора для лечения аскофероза у пчел. Материалы I Межд. научной конференции «Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы» Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. — С. 509-512
7. Хамадиева А.Р. Кутлин Н.Г., Шареева З.В., Назмиев Б.К., Салтыкова Е.С., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Влияние препарата на основе хитозана на зимостойкость пчел // Пчеловодство. 2012. №3. С. 18-20.

8. Шафикова В.М., Фархутдинов Р.Г. Влияние фитопрепарата «Фитоаск» на активность фермента каталазы и пероксидазы у пчелы медоносной *Apis mellifera mellifera* // Вестник Башкирского университета. 2013. Т. 18. № 4. С. 1085-1087.
9. Чечёткина У.Е., Евтеева Н.И., Речкин А.И. Сравнение пейзажа энтеробактерий медоносных пчел *Apis mellifera mellifera* L. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2010, № 2 (2), С. 475–478
10. Чечёткина У.Е., Евтеева Н.И., Речкин А.И., Радаев А.А. Энтеробактерии в составе микрофлоры пищеварительной системы медоносных пчёл в различные сезоны года. // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. - 2011 г. № 2 (2), С. 149-153.
11. Юмагужин Ф.Г., Сафаргалин А.Б. "Сезонные изменения активности каталазы ректальных желез. // Пчеловодство 2013. № 8, С.18-19.
12. Юмагужин Ф.Г., Сафаргалин А.Б. Активность каталазы ректальных желез у медоносных пчел // Аграрная наука. -2009. -№ 10, -С.24-25.

УДК 581.1

ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ ПРИ ДЕФИЦИТЕ ВОДЫ И ФОСФОРА

Федяев В.В. ¹, Шарипова Г.В. ², Веселов Д.С. ², Фархутдинов Р.Г. ¹, Веселов С.Ю.¹

¹Башкирский государственный университет

²Институт биологии Уфимского научного центра РАН

В естественных условиях обитания растения часто испытывают дефицит воды и фосфора, что отрицательно сказывается на их росте и продуктивности. Как и во всем мире, во многих регионах России выпадает недостаточно осадков для нормального роста растений. Эта тенденция усиливается из-за повсеместного возрастания аридности климата. Относительно фосфора важно отметить, что способность фосфатов образовывать нерастворимые в воде соли железа и алюминия снижает доступность фосфора для растения даже в почвах с его высоким содержанием. Таким образом, велика вероятность того, что растения могут оказаться под воздействием этих двух неблагоприятных факторов (дефицита воды и фосфора), откуда вытекает необходимость изучения влияния на растения их сочетания. Между тем, в большинстве случаев изучение дефицита воды и фосфора проводили отдельно друг от друга [см. ссылки обзоров 1; 2]. Данная работа направлена на восполнение этого пробела. Мы сделали акцент на водных отношениях, важность которых при дефиците воды очевидна и не требует аргументации. В случае дефицита фосфора интерес к водным отношениям обусловлен имеющимися данными о его влиянии на гидравлическую и устьичную проводимость растений [3].

Семена ячменя (*Hordeum vulgare* L, сорт Михайловский) проращивали на водопроводной воде в темном термостате. Через сутки одновременно

проклюнувшиеся проростки переносили на 10%-ный раствор Хогланда-Арнона без микроэлементов (температура $27\pm 3^\circ\text{C}$, светопериод 16 часов). Половину растений выращивали на полной питательной среде (контроль), другую часть - в условиях дефицита фосфора на растворе с исключением соответствующей соли.

На 7-е сутки от момента посева семян у проростков удаляли зерновку. На 8 сутки растения помещали на 50% раствор полной питательной смеси Хогланда-Арнона (контроль) и с исключением фосфора. 9-суточные растения использовали для проведения исследований с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 в концентрации 6 и 12%, что соответствовало осмотическому давлению 0,37 и 1,20 МПа соответственно.

Через сутки после начала осмотического стресса измеряли транспирацию по потере веса стаканчиками с растениями, водный потенциал - с помощью психрометра "Psypro" (Wescor, USA), взвешивали корни и рассчитывали гидравлическую проводимость по формуле $L = T \times (\Psi_s - \Psi_l) \cdot P^{-1}$, где T - транспирация, P - вес корней, Ψ_s и Ψ_l - водный потенциал питательного раствора и листа соответственно [4].

Измерения транспирации показало, что дефицит фосфора снижал транспирацию в среднем на 12%. Добавление ПЭГ также снижало транспирацию. Как известно, градиент водного потенциала между листьями и питательным раствором служит движущей силой для поддержания транспирационного потока [см. ссылки в обзоре 1]. Таким образом, снижение осмотического потенциала питательного раствора в результате добавления ПЭГ уменьшает этот градиент, что приводит к падению скорости транспирации. На фоне 12 % ПЭГ степень дополнительного снижения до 60% по сравнению с контролем была одинаковой, не зависимо от условий минерального питания (рис. 1). В случае же 6 % ПЭГ реакция на осмотическое воздействие зависела от уровня фосфора в среде. На фоне его дефицита снижение транспирации под влиянием ПЭГ было выражено в меньшей степени (рис. 1). В результате 6 %-ный ПЭГ был выбран для дальнейшей работы.

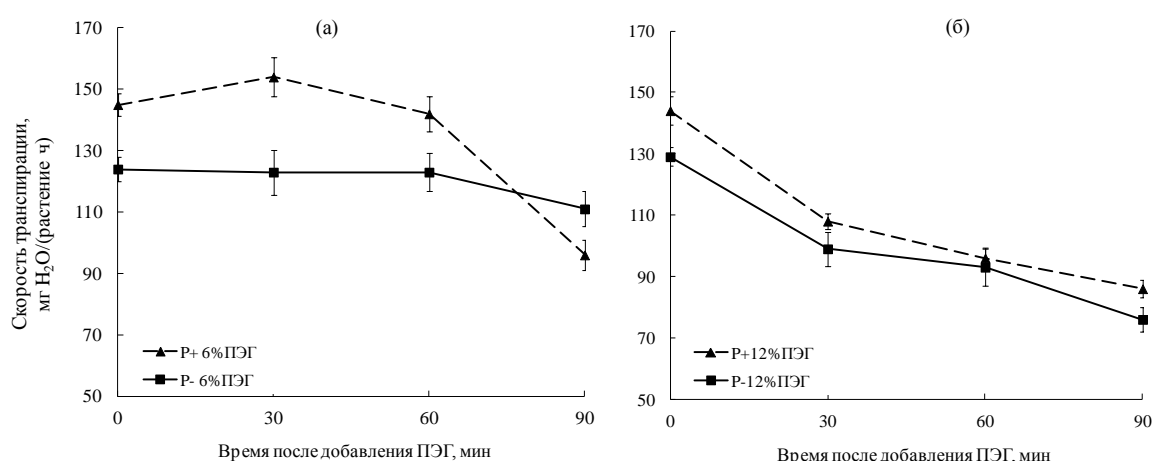


Рис. 1. Влияние добавления полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 в питательный раствор в концентрациях 6% (а) и 12% (б) на транспирацию растений ячменя, растущих на полной питательной смеси (P+) и на дефиците фосфора (P-).

Измерение водного потенциала показало, что дефицит фосфора приводил к его снижению (таблица). Очевидно, это было результатом снижения гидравлической про-

водимости под влиянием изменения состава питательной среды. Наши результаты в этом плане соответствуют данным литературы, которые также указывают на снижение гидравлической проводимости под влиянием дефицита фосфора [3]. Следует отметить, что снижение устьичной проводимости при этом было небольшим. По всей видимости, приток воды из корней поддерживался за счет снижения водного потенциала листьев. Как указывалось выше, градиент водного потенциала между листьями и питательным раствором служит движущей силой для поддержания транспирационного потока. Вместе с тем, так называемые изогидрические растения (например, кукуруза) поддерживают неизменным водный потенциал листьев за счет закрытия устьиц и снижения потерь воды с транспирацией [5]. Пшеница относится к анизогидрическим растениям, способным в определенных пределах переносить снижение водного потенциала в том случае, когда осмотическое приспособление предотвращает снижение тургора [6].

Таблица 1.

Влияние 6% полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 и дефицита фосфора (P-) на водный потенциал (ВП, МПа) и гидравлическую проводимость (ГП, 1*растение⁻¹ ч⁻¹ МПа⁻¹) растений ячменя сорта Михайловский.

Показатели	P+	P+, ПЭГ	P-	P-, ПЭГ
ВП	0,31±0,07	0,96±0,19	0,38±0,06	0,63±0,09
ГП	171±49	42±10	127±19	132±42

Добавление ПЭГ в питательный раствор в 3 раза снижало водный потенциал растений, которые получали фосфаты с питательным раствором. Эти результаты легко связать с данными по их гидравлической проводимости: на фоне достаточного снабжения фосфатами она резко (в 4 раза) снижалась. Этим объясняется уменьшение водного потенциала, несмотря на снижение потерь воды с транспирацией. Снижение гидравлической проводимости у растений, которые и так испытывают трудности с поглощением воды на фоне добавления ПЭГ, могут показаться неожиданными. Тем не менее, при дефиците воды неоднократно было зарегистрировано снижение гидравлической проводимости [7]. Этот эффект объясняют тем, что увеличение сопротивления движению воды ограничивает риск снижения оводненности клеток корней за счет ее выхода из клеток в раствор с низким водным потенциалом. Повышение гидравлической проводимости вслед за ее снижением под влиянием осмотического стресса было зарегистрировано в корнях кукурузы после того, как клетки корней накапливали осмотики, что увеличивало их водоудерживающую способность [8].

У дефицитных по фосфатам растений степень снижения была меньше, и на фоне ПЭГ водный потенциал этих растений был выше (меньшие по величине отрицательные значения), чем «сытых» растений (таблица). Меньшую степень уменьшения водного потенциала дефицитных по фосфатам растений легко объяснить тем, что у них, в отличие от «сытых» растений гидравлическая проводимость под влиянием ПЭГ не снижалась. Представляет интерес выяснить, за счет какого механизма дефицитные по фосфатам растения в отличие от «сытых» могли «позволить себе» не снижать гидравлическую проводимость при добавлении ПЭГ. Как указывалось выше, по данным литературы необходимость защитить клетки от обезвоживания путем снижения гидравлической проводимости при добавлении ПЭГ отпадала в результате осмотической регуляции [8]. Можно предполагать, что дефицит фосфора обеспечивал адаптацию растений за счет накопления осмотиков. На такую возможность указывают данные литера-

туры о том, что стрессовые воздействия повышают концентрацию в клетках сахаров, являющихся основным осмотиком. Наши дальнейшие исследования должны быть направлены на проверку этого предположения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, госзадание № 01201456413, а также Грантов РФФИ №№12-04-01111 и 14-04-97077.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60. №2. С. 165–175.
2. Niu YF, Chai RS, Jin GL, Wang H, Tang CX, Zhang YS. Responses of root architecture development to low phosphorous availability: a review // Annals of Botany. 2013. V.112. P. 391–408.
3. Radin JW, Eidenbock MP. Hydraulic conductance as a factor limiting leaf expansion of phosphorus-deficient cotton plants // Plant Physiology. 1984. V.75. P. 372–377.
4. Кудоярова Г.Р., Веселов Д.С., Шарипова Г.В., Ахиярова Г.Р., Dodd I.C., Веселов С.Ю. Водный обмен и рост исходных и дефицитных по АБК мутантных растений ячменя при повышении температуры воздуха // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 2. С. 207–213.
5. Tardieu F. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress // Comptes Rendus Geosciences. 2005. V. 337. P. 57–67.
6. Zhang J, Nguyen HT, Blum A (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants // Journal of Experimental Botany. V. 50. P. 292–302.
7. Steudle, E. Water uptake by roots: effects of water deficit // Journal of Experimental Botany. 2000. V.51. P. 1531–1542.
8. Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schaffner AR. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA // Journal of Experimental Botany. 2005. V. 56. P. 2971–2981.

УДК 632.76: 595.768.12

ПРОТЕИНАЗЫ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА И ИХ ИНГИБИТОРЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ ПАСЛЕНОВЫХ РАСТЕНИЙ

**Цветков В.О.¹, Ибрагимов Р.И.¹, Шпирная И.А.¹, Марданшин И.С.²,
Валиахметова К.И.¹, Яруллина Л.Г.^{1,3}**

¹Башкирский государственный университет

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН

³Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

Для насекомых, питающихся растительной пищей с несбалансированным содержанием аминокислот, эффективное переваривание растительных тканей является насущной необходимостью. В процессах переваривания и усваивания пищевого субстрата большую роль играют протеолитические ферменты фитофага и их ингибиторы из растений.

Подавляя активность ферментов, обеспечивающих процессы протеолиза в пищеварительной системе, ингибиторы протеиназ снижают поступление аминокислот, в т.ч. и незаменимых, в организм насекомого. Наличие в растительной пище нескольких ингибиторов этих ферментов, существенно снижает его усвояемость, что способствует ограничению роста и развития насекомых (Kessler, Baldwin, 2002; Zhu-Salzman et al., 2004; Kempema et al., 2007).

Доказательства защитной функции ингибиторов протеиназ впервые были представлены в работе С. Риана с сотр. (Green, Ryan, 1972), когда повреждение растений картофеля колорадским жуком вызывало в них активацию и синтез «de novo» защитных молекул, в т.ч. белков (пептидов), подавляющих активность протеиназ. Причем, повреждение даже одного листа вызывало активацию ингибиторов протеиназ во всем растительном организме (Walker-Simmons et al., 1983). Оказалось, что механическое поранение листьев картофеля стимулирует транскрипцию генов белковых ингибиторов цистеиновых и аспартильных протеиназ (Hildmann et al., 1992). Получены сведения и о том, что в листьях картофеля активирование генов ингибиторов протеиназ происходит с участием жасмонатного сигнального пути (Lawrence et al., 2007).

Между тем, потребление растительной пищи с высоким содержанием ингибиторов вызывает в организме насекомых ответные реакции, приводящие к изменению его метаболизма. Так, добавление в пищу низкомолекулярного ингибитора цистеиновых протеиназ E-64 приводило к значительной задержке роста личинок колорадского жука и других представителей отряда Coleoptera (Hines et al., 1990). Между тем, кормление личинок листьями картофеля с повышенным содержанием ингибитора конкретной пищеварительной протеиназы стимулирует синтез в кишечнике насекомых других ферментов, неспецифичных к данному ингибитору (Brunelle et al., 2004).

Настоящая работа посвящена исследованию физико-химических свойств протеиназ колорадского жука и их ингибиторов из листьев пасленовых растений, влияния видовых и сортовых особенностей растений на биохимические и физиологические параметры насекомых.

Наши результаты показывают, что желатингидролизующие ферменты личинок колорадского жука представлены 3-мя низкомолекулярными (M около 25 кДа) и 5-ю высокомолекулярными белковыми компонентами (M около 70 кДа). Значения изоэлектрических точек низкомолекулярных и высокомолекулярных протеаз лежат в слабнокислой области pH, в интервале от 5 до 6.

Ингибиторы протеиназ *L. decemlineata* в листьях картофеля представлены 5-ю низкомолекулярными формами со значениями молекулярных масс около 25-30 кДа. Значения изоэлектрических точек этих белков находятся в слабнокислой и нейтральной областях (pH 5.5 – 7.5). Эти молекулы могут представлять собой ингибиторы сериновых протеаз типа ингибитора Кунитца и ингибиторы катепсин-подобных ферментов. Эти типы ингибиторов широко представлены у пасленовых растений, в т.ч. у картофеля [Валуева, Мосолов, 2002].

Одним из механизмов приспособления насекомых к растительным субстратам с различным биохимическим составом является высокая пластичность пищеварительной системы. Как показывают наши данные, кормление личинок колорадского жука листьями растений различных видов и сортов приводит к изменению уровня протеолитической активности. Так, кормление личинок насекомых листьями картофеля или баклажана повышает активность желатингидролизующих ферментов, по сравнению с голодающими насекомыми, на 10-40%. При потреблении листьев томатов активность этих протеиназ у личинок, наоборот, снижается в 2 раза.

Результаты SDS-электрофореза беков *L. decemlineata*, полученных на ПААГ-желатине из гомогенатов личинок, выявляет 5 молекулярных форм протеиназ. При этом электрофоретическая картина разделения образцов, полученных из голодающих личинок, и насекомых, питающихся листьями различных видов растений, не различается. Наблюдаемые нами изменения в уровне активности этих протеиназ могут быть обусловлены изменением относительной активности отдельных молекулярных компонентов протеолитического комплекса личинок. На вредителе зерновых культур *Callosobruchus maculatus* показано, что насекомые способны изменять уровень протеолитической активности как за счет модуляции экспрессионной активности генов, так и путем посттрансляционных модификаций основных пищеварительных протеиназ [Zhu-Salzman et al., 2004].

Насекомые характеризуются неодинаковой пищевой активностью по отношению к различным сортам картофеля. Интересно отметить, что наиболее предпочитаемыми оказались листья устойчивого сорта Башкирский; листья сортов с меньшим показателем устойчивости поедались насекомыми менее интенсивно. В целом, экспериментальные насекомые за 1 сутки съедали на 5-10 мг (на 20-25%) больше листьев картофеля сорта Башкирский, чем листьев сортов Удача и Невский. Обнаруженный факт высокой пищевой активности по отношению к устойчивому сорту свидетельствует о включении у насекомых компенсаторных механизмов «встречной» защиты, направленного на компенсацию антипитательного эффекта, вызванного высоким уровнем активности ингибиторов в растительной пище.

Среди исследуемых сортов картофеля растения высокоустойчивого сорта Башкирский обладали наиболее высоким уровнем ингибиторной активности: показатель активности ингибиторов протеиназ в листьях растений этого сорта более чем в 2 раза выше, чем в листьях восприимчивого сорта Невский, и в 1.8 раз выше, чем в листьях среднеустойчивого сорта Удача. Аналогичные сведения о повышенном потреблении пищи ранее были получены при кормлении личинок *Spodoptera littoralis* и *Leptinotarsa decemlineata* листьями трансгенных растений с высоким уровнем активности ингибиторов трипсина и орзистатина (Ahn et al., 2004).

Уровень пищевой активности представителей насекомых из различных выборок по отношению к конкретному сорту картофеля характеризует, по-видимому, и биохимическую гетерогенность представителей локальных популяций насекомых, в частности, неодинаковый исходный уровень пищеварительных гидролаз у насекомых. Хотя колорадский жук относится к монотипическим видам, различные популяции насекомых обладают высоким уровнем полиморфизма на различном уровне: от генетического до фенетического (Удалов, Беньковская, 2011).

Сортовые различия в химическом составе растительной пищи оказывает существенное влияние и на параметры плодовитости и выживаемости насекомых. Наибольшее количество яиц насекомые откладывали при питании растениями неустойчивого сорта Невский. Несколько меньшее количество яиц отложено насекомыми при питании листьями сорта Башкирский. При кормлении насекомых листьями сорта Удача получены самые низкие значения этого показателя. Следует отметить, что количество кладок насекомого при питании листьями сорта Удача было также наименьшим – 10.5 в расчете на 1 самку, тогда как при питании листьями сорта Невский этот показатель составил 56.6, сорта Башкирский – 26.6.

Таким образом, кормление листьями сорта Удача существенно снижает плодовитость насекомых: количество яиц, отложенных самками, снижается более чем в 3 раза, количество кладок – в 2.5-5.5 раза по сравнению с вариантами с листьями сортов

Невский и Башкирский. Такое интенсивное подавление плодовитости может свидетельствовать о недостаточном усвоении развивающимися насекомыми компонентов кормового субстрата. Можно предположить, что ограничение плодовитости самок на этапе откладки яиц является основным фактором, обуславливающим, в целом, устойчивость этого сорта к поражению насекомыми. Такая способность насекомых колорадского жука оценивать пригодность растений для откладывания яиц и выведения потомства отмечена ранее на различных сортах картофеля (Hitchner et al., 2008.).

Динамика смертности (выживаемости) личинок при развитии их на листьях различных сортов существенно различается. Наибольшее суммарное значение коэффициента смертности выявляется при развитии личинок на сорте Башкирский; при питании листьями сортов Невский и Удача этот показатель значительно ниже. Высокий уровень смертности насекомых можно объяснить относительно высоким содержанием в листьях этого сорта ингибиторов пищеварительных гидролаз насекомого, в частности, ингибиторов протеиназ. Развитие личинок на поздних этапах развития (3-4 стадия) связано с многократным увеличением массы тела (Ушатинская и др., 1981) и, следовательно, с повышением интенсивности обменных процессов, требующих значительных затрат химических веществ и энергии для синтеза *de novo* биологических молекул. Логично предположить, что часть развивающихся личинок погибает из-за недостаточного поступления растительных аминокислот, в первую очередь, незаменимых аминокислот, вследствие подавления активности пищеварительных протеиназ насекомых растительными ингибиторами [39, 40]. Соответственно, хорошая усваиваемость пищевого материала способствует снижению коэффициента смертности насекомых (сорт Невский), плохая усваиваемость пищи, наоборот, повышает коэффициент смертности насекомых (сорт Башкирский).

Коэффициент смертности коррелирует и со скоростью развития некротических реакций в зоне прикрепления яичной кладки к листовой пластине. Исследуемые сорта характеризуются различной скоростью развития некротических реакций и формирования некрозного пятна после откладки на листьях яиц насекомых. Некротизация участка листовой пластинки приводит к гибели личинок на эмбриональной стадии развития. В наших опытах минимальный показатель эмбриональной смертности соответствует максимальному интервалу времени проявления некроза (сорт Невский). В тоже время, относительно быстрое проявление некроза сочетается с максимальным значением коэффициента эмбриональной смертности (сорт Башкирский) насекомых.

Полученные результаты исследований позволяют детализировать механизмы взаимоотношений колорадского жука и картофеля, выявить сортовые особенности проявления устойчивости растений к поражению насекомыми. Свойство устойчивости или восприимчивости сортов картофеля к вредителю зависит как от биохимических параметров самого растительного организма, так и от особенностей насекомого – представителя определенной популяции. Особая роль при взаимодействии насекомых и растений принадлежит протеолитическим ферментам насекомого и специфическим белкам картофеля, подавляющим активность этих ферментов. Высокая степень устойчивости сорта определяется сочетанием, по крайней мере, двух биохимических факторов: некрогенетического (скорость некротизации листовой пластинки) и ингибиторного (уровень активности ингибиторов гидролаз). Вследствие этого, эффективная элиминация потомства вредителя происходит и на эмбриональной стадии, и на преимагинальных стадиях развития, что, в конечном счете, определяет низкий уровень повреждения растений.

Данная работа выполнялась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания (№ госрегистрации 01201456414).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kessler A, Baldwin IT // *Annu Rev Plant Biol.*, 2002. 53: 299–328
2. Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn JE, Koiwa H // *Plant Physiol.*, 2004. 134: 420–431.
3. Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL // *Plant Physiol.*, 2007. 143: 849–865.
4. Green TR, Ryan CA // *Science* 1972. 175: 776–777.
5. Walker-Simmons M., Hadwiger L., Ryan C. // *Am Soc Plant Biol.*, 1983. 110: 194–199.
6. Hildmann T., Ebner M., Peiia-Cortth H., Sánchez-Serrano J., Willmitzer L., Prat S. // *The Plant Cell*, 1992. 4: 1157-1170.
7. Lawrence S., Novak N., Ju C., Cooke J. // *J Chem Ecol.*, 2008, 34:1013–102.
8. Hines M., Nielsen S., Shade R., Pomeroy M. // *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1990, 57: 201–207.
9. Валуева Т.А., Мосолов В.В. // *Успехи биологической химии*, 2002, 42: 193-216.
10. . Удалов М.Б., Беньковская Г.В. // *Вавиловский ж. генетики и селекции*, 2011, 15: 156-172.
11. Hitchner. E. M., Kuhar T. P., Dickens J. C. // *J. of Econ. Entomol.*, 2008, 101: 859-865.
12. Колорадский картофельный жук, *Leptinotarsa decemlineata* Say: Филогения, морфология, физиология, экология, адаптация, естеств. враги. / Р. С. Ушатинская, Е. П. Иванчик, С. С. Ижевский / , М.:, Наука, 1981. 375 с.

УДК 579.64

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* В КОМПЛЕКСЕ С САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО РИЗОСФЕРЫ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Широков А.В., Ласточкина О.В., Юлдашев Р.А., Пусенкова Л.И.

Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН,
г. Уфа, Россия

Болезни, вызванные фитопатогенными грибами, значительно снижают качество и продуктивность растений картофеля (*Solanum tuberosum* L), являющегося одной из наиболее важных продовольственных культур. К числу перспективных и экологически безопасных агентов защиты относятся стимулирующие рост растений микроорганизмы, действие которых обусловлено синтезом широкого спектра биологически активных веществ в окружающую среду [Berg, 2009; Pérez-García et al., 2011], а также участием в запуске системной устойчивости, где важная роль отводится, в частности, такой сигнальной молекуле как салициловая кислота (СК) [García-Gutiérrez et al., 2013]. Предполагается, что главным элементом воздействия внедренных микроорганизмов является биоконтроль с их стороны за ростом и развитием патогенных микроорганизмов посредством экскреции ими антибиотиков и ингибиторов роста грибов [Beneduzi et al., 2012]. Микромицеты яв-

ляются одним из негативных факторов воздействия на растения, как в плане распространения грибковых болезней, так и формирования урожая. В то же время весьма желательно увеличение численности бактерий в ризосферной зоне растений, так как часть бактериального сообщества обладает фунгицидным и/или фунгистатическим потенциалом. Таким образом, соотношение микромицетов и бактерий в почве является одним из ключевых факторов обуславливающих продуктивность растений.

Целью данной работы являлось изучение влияния предпосевной обработки семян картофеля культуральной жидкостью (КЖ) бактерий *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (штаммы 10-4 и 12-2) как в отдельности, так и в комплексе с СК на микробное сообщество ризосферы и продуктивность растений картофеля.

Исследования проводились на растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача в условиях микроделяночного опыта на базе Бирского ОПХ (Башкортостан, Россия). Экспериментальные образцы штаммов 10-4 и 12-2 культивировались в лабораторных условиях на установке шейкерного типа при 37°C в течение 2 суток до достижения общего титра планктонных клеток $\sim 1 \times 10^9$ КОЕ/мл. В качестве питательной среды использовалась картофельно-глюкозная среда стандартного состава. После культивирования нарабатанная биомасса штаммов экспонировалась в течение 7 суток для накопления максимальных количеств фунгицидных метаболитов. Предпосевную обработку проводили путем замачивания клубней в КЖ штаммов *B. subtilis* 10-4 (10^5 КОЕ/мл) и 12-2 (10^4 КОЕ/мл) [Lastochkina et al., 2012], как в отдельности, так и в композиции с СК (0.05 мМ) [Шакирова, Безрукова, 1997] или в воде (контроль) в течение 30 минут. Общий титр аэробных бактерий и микромицетов определяли с использованием стандартных методов микробиологии. Все опыты проводились в трех биологических и трех аналитических повторностях.

Как видно из таблицы 1, предпосевная обработка клубней картофеля КЖ бактерий *B. subtilis* значительно снизила содержание аэробных бактерий и микромицетов. При этом необходимо отметить, что если количество бактерий уменьшилось в 2-4 раза, то численность микроскопических грибов уменьшилась в 10 и более раз по сравнению с контролем, что указывает на изменение соотношения грибов и бактерий в пользу последних. В то же время в вариантах с использованием СК численность микромицетов была в 2-3 раза ниже, чем в вариантах только со штаммами *B. subtilis* 10-4 и 12-2 без СК, а численность бактерий даже увеличилась.

Таблица 1.

Влияние предпосевной обработки КЖ бактерий *B. subtilis* и СК на общую численность аэробных бактерий и микромицетов в ризосфере картофеля.

	Общий титр аэробных бактерий, $\times 10^8$ КОЕ/г	Общий титр микромицетов, $\times 10^4$ КОЕ/г
Контроль	105±5	400±10
<i>B. subtilis</i> 10-4	40±3	45±3
<i>B. subtilis</i> 10-4 + СК	52±3	20±2
<i>B. subtilis</i> 12-2	23±1	30±2
<i>B. subtilis</i> 12-2 + СК	50±3	11±1

Таким образом, предпосевная обработка клубней картофеля КЖ бактерий *B. subtilis* как в отдельности, так и в комплексе с СК активно воздействует на баланс ризосферных бактерий и микромицетов в сторону увеличения бактериальной популяции, что снижает патогенную нагрузку на растения, и в свою очередь должно благоприятно сказаться на формировании урожая.

Действительно, как видно из рисунка 1, предобработка клубней картофеля КЖ бактерий *B. subtilis* в отдельности и в комплексе с СК способствует увеличению продуктивности картофеля. При этом необходимо отметить, что штамм *B. subtilis* 12-2 в рамках данного опыта оказался более эффективен, чем штамм *B. subtilis* 10-4 при воздействии на рост и развитие клубней картофеля, что вероятно, обусловлено природой синтезируемых этими штаммами низкомолекулярных метаболитов.

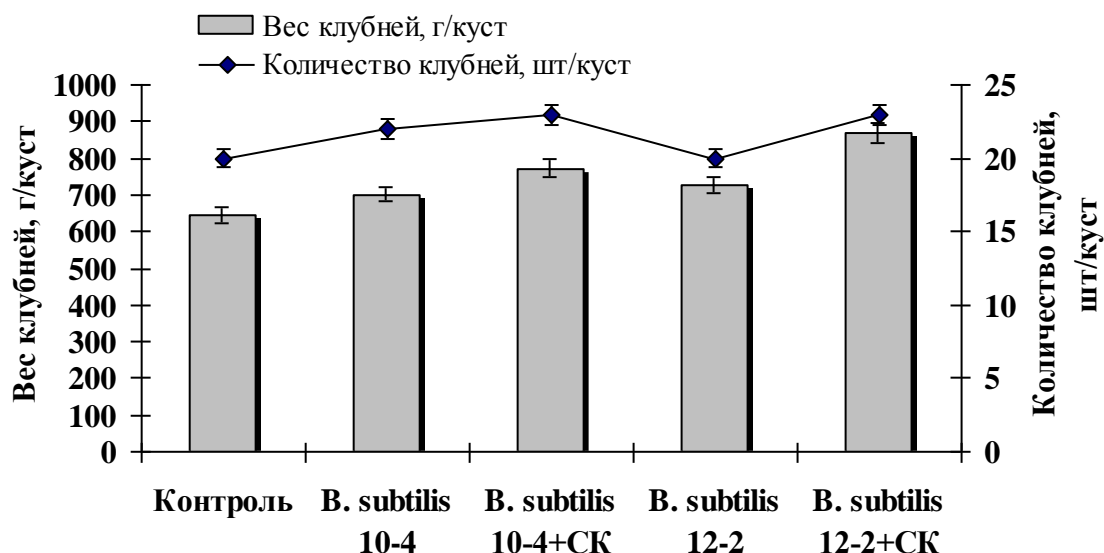


Рис. 1. Влияние предпосевной обработки клубней КЖ штаммов *B. subtilis* 10-4 и 12-2 в отдельности и в комплексе с СК на продуктивность картофеля.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что новые штаммы *B. subtilis* 10-4 и 12-2 являются весьма перспективными агентами биоконтроля фитопатогенов, и в комплексе с СК, могут стать основой нового высокоэффективного полифункционального биологического препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl Microbiol. Biotechnol. 2009, 84 (1):11-18.
2. Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents // Genetics and Molecular Biology. 2012, 35, 4 (suppl):1044-1051.
3. García-Gutiérrez L., Zerrouh H., Romero D., Cubero J., de Vicente A., Pérez-García A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate - and salicylic acid-dependent defence responses // Microb Biotechnol. 2013, 6 (3):264-274.
4. Lastochkina O.V., Il'yasova E.Yu., Shirokov A.V., Pusenkova L.I. Antifungal and growth stimulating activities of new *Bacillus subtilis* strains // «Scientific enquiry in the contemporary world: theoretical basics and innovative approach». L&L Publishing. Titusville, FL, USA. 2012, 1:96-98.
5. Pérez-García, A., Romero, D., and de Vicente, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture // Curr Opin Biotechnol. 2011, 22: 187–193.
6. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Индукция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к засолению среды // Известия РАН. Серия биол. 1997, 2:149-153.

УДК 635.21:632.4

ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА ЗАЩИТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ФИТОФТОРОЗУ

Яруллина Л. М.¹, Умаров И.А.¹, Исаев Р.Ф.², Новоселова Е.И.¹, Ибрагимов Р.И.¹

¹ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

²ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»,
г. Уфа, Россия

Введение

В современных агротехнологиях широко используются химические средства, подавляющие рост и развитие патогенных микроорганизмов. Однако интенсивное применение пестицидов приводит, с одной стороны, к химическому загрязнению экосистем и, соответственно, ухудшению качества продукции растениеводства, и с другой - к обеднению видового состава полезной микрофлоры, появлению новых, более агрессивных и устойчивых к пестицидам форм возбудителей болезней. Известно, что обработка растений биологическими средствами защиты приводит к значительным изменениям в метаболизме, повышая их устойчивость [1]. Детально механизмы формирования таких защитных реакций организмов не изучены. Считается, что биопрепараты вызывают активацию тех физиолого-биохимических процессов, которые участвуют в формировании неспецифического ответа растений на внешнее стрессовое воздействие. Важная роль в формировании защитного ответа растений на стрессовые факторы различной природы отводится активным формам кислорода и, прежде всего, перекиси водорода [2]. В связи с открытием защитной и сигнальной функций H₂O₂, интенсивно исследуются механизмы регуляции ее уровня [3]. Стало известно, что препараты - иммуностимуляторы могут активизировать защитные механизмы растений на длительное время [4]

Одной из наиболее опасных болезней картофеля является фитофтороз. Вредность болезни зависит от целого ряда факторов, прежде всего от болезнеустойчивости возделываемых сортов и погодных условий. Возбудитель болезни – гриб *Phytophthora infestans* при продолжительной влажной погоде развивается весьма интенсивно, снижая урожайность из-за преждевременного отмирания ботвы, а также гниения пораженных клубней в период их хранения.

Целью настоящей работы было изучение влияния обработки клубней и растений биопрепаратами на формирование защитного потенциала картофеля.

Материалы и методы

Объектами исследования служили клубни и листья вегетирующих растений картофеля сортов Удача, Луговской и Невский – широко возделываемые на территории Южного Урала, различающиеся по устойчивости к возбудителю фитофтороза *Ph. infestans*. Покоящиеся клубни перед посадкой обрабатывали путем опрыскивания препаратами Ризоплан (0,25 г/кг) и Гуми (5 г/кг). В качестве контроля клубни обрабатывали водой и фунгицидом Поликарбацин (2,6 г/кг). В предварительных исследованиях препараты в указанных концентрациях оказывали максимальное защитное действие от возбудителя фитофтороза. Вегетирующие растения опрыскивали препаратами в фазу полной всхожести. Через 24 ч после обработки в листьях картофеля определяли

содержание H_2O_2 , активность каталазы и пероксидазы. Для этого листья гомогенизировали в 0.025 М фосфатном буфере, pH 6.2, в соотношении 1:3, центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин. Супернатант использовали для определения содержания H_2O_2 и активности ферментов. Содержание H_2O_2 оценивали при 560 нм с использованием кислородного оранжевого. Активность пероксидазы определяли микрометодом по окислению раствора ортофенилендиамина (ОФД). Активность каталазы определяли с использованием 4% молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряем на спектрофотометре при длине волны 410 нм. Интенсивность развития фитофтороза оценивали по проценту поражения листовой пластины в фазу бутонизации.

Измерения проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторах. Для вегетационных опытов в каждом варианте насчитывалось не менее 20 растений. Статистическую обработку данных производили с использованием компьютерных программ фирмы StatSoft (Statistica 6.0).

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы 1, листья картофеля с различной полевой устойчивостью отличались как содержанием перекиси водорода, так и активностью антиоксидантных ферментов. Причем, в листьях устойчивого к фитофторозу сорта Башкирский уровень H_2O_2 был в среднем на 25% выше, чем у среднеустойчивых сортов Удача и Невский. Интересно, что по активности каталазы изучаемые сорта незначительно отличались друг от друга. В то же время, по активности пероксидазы листья картофеля сорта Невский в 5 и 10 раз превышали уровень данного показателя у сортов Башкирский и Удача соответственно. Полученные данные предполагают, что повышенный уровень H_2O_2 является результатом активации прооксидантных ферментов. Наблюдаемое снижение уровня активности пероксидазы, возможно, обусловлено интенсивным прохождением процессов лигнификации в тканях. Как известно, оба этих процесса, обеспечивают высокую сопротивляемость растений внедрению и развитию патогенов [5].

Обработка биопрепаратами приводила к повышению уровня H_2O_2 и изменению активности каталазы и пероксидазы в листьях картофеля. Особенно эффективным оказался препарат Ризоплан (табл.1). Так под воздействием обработки Ризопланом продукция H_2O_2 увеличилась в листьях среднеустойчивых сортов Удача и Невский на 35%, а активность пероксидазы на 50%. Пероксидаза является полифункциональным ферментом. Ее основная функция заключается в утилизации избытка H_2O_2 в процессах синтеза лигнина. Возможно, что одним из защитных механизмов биопрепаратов является сенсбилизация растительных тканей в результате повышения концентрации H_2O_2 , что способствует более быстрому и эффективному развитию защитного ответа при инфицировании, в том числе за счет интенсификации процессов лигнификации.

Анализ развития фитофтороза на ботве картофеля показал, что предпосевная обработка клубней картофеля биопрепаратами благоприятно отражается на защитном потенциале вегетирующих растений (табл. 2).

Так в необработанных образцах минимальная степень поражения листовой пластины фитофторозом наблюдалось у растений картофеля устойчивого сорта Башкирский (28%). Предпосевная обработка клубней Ризопланом обеспечивала защитный эффект для растений всех исследуемых сортов на уровне фунгицида (70-80%). Защитное действие препарата Гуми от фитофторы было несколько ниже (64-75%).

Таблица 1.

Влияние биопрепарата Ризоплан на содержание H₂O₂ и активность антиоксидантных ферментов в листьях картофеля различных сортов.

Сорт	H ₂ O ₂ , мкМ/г сырого веса		Активность каталазы, катал		Активность пероксидазы, ед/г сыр веса	
	I	II	I	II	I	II
Башкирский	10,2±0,94	13,2±0,98	5069±49	5369±62	0,67±0,02	0,89±0,05
Удача	8,1±0,03	12,1±0,79	4662±34	5337±43	0,32±0,01	0,64±0,03
Невский	7,4±0,02	11,3±0,96	4129±38	5893±61	3,11±0,14	5,03±0,17

Примечание. I – перед обработкой (контроль); II – через 24ч после обработки.

Таблица 2.

Влияние биопрепаратов на развитие фитофтороза на листьях картофеля различных сортов при предпосевной обработке клубней, %.

Варианты	Контроль	Поликарбацин	Ризоплан	Гуми
Башкирский	28,0±2,0	20,0±1,0	20,0±2,0	25,0±2,0
Удача	37,0±3,0	25,0±3,0	25,0±2,0	32,0±3,0
Невский	40,0±3,0	29,0±2,0	30,0±3,0	36,0±4,0

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют говорить о том, что физиологическое значение действия биопрепаратов заключается в сдвиге метаболизма растений в сторону синтеза сигнальных молекул, таких как H₂O₂, запускающих механизмы повышения устойчивости растений картофеля к возбудителю фитофтороза.

Данная работа выполнялась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания (№ госрегистрации 01201456414).

ЛИТЕРАТУРА

1. Тютереv, С.Л. Научные основы индуцирования болезнеустойчивости растений / С.Л. Тютереv; – С-Пб; Инновационный центр защиты растений, ВИЗР. 2002. - 328 с.
2. Яруллина, Л.Г., Ибрагимов, Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам / Л.Г. Яруллина, Р.И. Ибрагимов – Уфа; Гилем, 2006. - 232 с.
3. Трошина, Н.Б., Яруллина, Л.Г., Сурина, О.Б., Максимов, И.В. Индукторы устойчивости растений и активные формы кислорода. III. Влияние бисола 2 и байтана на морфогенез и защитный ответ клеток каллусов пшеницы, инфицированных возбудителем твердой головни / Н.Б. Трошина, Л.Г. Яруллина, О.Б. Сурина, И.В. Максимов – Цитология. 2006. Т. 48, № 6. С. 495–499.
4. Шпирная, И.А., Ахатова, А.Р., Цветков, В.О., Яруллина, Л.М., Артемьева, М.А., Ибрагимов, Р.И. Иммуностимулирующий эффект препаратов - биорегуляторов при обработке клубней картофеля / И.А. Шпирная, А.Р. Ахатова, В.О. Цветков, Л.М. Яруллина, М.А. Артемьева, Р.И. Ибрагимов; – Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13, № 5 (3).
5. Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H.R., Mansfield, J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* / C.S. Bestwick, I.R. Brown, M.H.R. Bennett, J.W. Mansfield; – Plant Cell. 1997. V. 9. P. 209-221.

УДК 571.27

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ХИТООЛИГОСАХАРИДАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Яруллина Л.Г.^{1,2}, Касимова Р.И.¹, Ахатова А.Р.¹, Ибрагимов Р.И.²

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

²Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

Введение

Инфекционные болезни растений наносят значительный ущерб урожайности сельскохозяйственных растений. Важное направление в повышении устойчивости возделываемых культур – поиск экологически безопасных препаратов, действие которых основано на индукции естественных защитных механизмов растительного организма. В последние годы, достигнут значительный прогресс в исследовании механизмов формирования защитных реакций растений против фитопатогенов. Это связано с обнаружением и практическим использованием элиситоров, индуцирующих запуск местных и системных защитных реакций в растениях. Для разработки технологии использования такого рода препаратов необходимы сведения о связи биологической активности с их молекулярной структурой [1].

Обнаружено, что наиболее эффективными элиситорами являются полисахаридные компоненты клеточных стенок фитопатогенов, в частности, производные хитина [2]. Особый интерес при изучении механизма индуцирующего действия на иммунный потенциал растительных клеток среди них представляют водорастворимые низкомолекулярные хитоолигосахариды (ХОС).

Одним из механизмов защитного действия ХОС является активация генов, регулирующих синтез патоген-индуцируемых белков, в частности, оксалактоксидазы и пероксидазы [3]. Показано, что определенную роль в специфичности проявления биологической активности производных хитина имеет степень ацетилирования (СА) биополимера [4]. Учитывая, что стратегия защитного ответа растений определяется типом пищевой специализации патогена, то весьма важным является изучение воздействия ХОС с различной СА на защитный потенциал растительных клеток в каждой конкретной патосистеме.

Цель данного исследования – изучение изменений экспрессии генов защитных белков (оксалактоксидазы, анионной пероксидазы, хитиназы, ингибитора протеиназы) при обработке семян пшеницы ХОС с различной СА и последующем инфицировании возбудителями грибных болезней с различным типом трофности.

Материалы и методы

Объектом исследования служили проростки пшеницы *T. aestivum* L. сорта Жница. Заражение пшеницы некротрофным патогеном – возбудителем корневой гнили *Bipolaris sorokiniana* (Sass.) вызывали путем полива основания стеблей 5-суточных проростков суспензией конидий гриба в воде из расчета 10^6 спор/мл. В другой серии экспериментов отрезки листьев 7-суточных проростков инокулировали суспензией пикноспор гемиотрофного гриба – возбудителя септориоза *Septoria nodorum* Berk. (10^6 спор/мл).

ХОС со СА 30% и 65% в концентрации 1 мг/л использовали для полусухой обработки семян пшеницы из расчета 20 мкл/г. В контроле семена обрабатывали водой.

РНК из растений выделяли фенольно-детергентным методом. Для получения кДНК на основе мРНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы согласно протоколу фирмы-поставщика. С помощью программы «Primer Select» (DNASar) были подобраны высокоспецифичные праймеры к генам оксалатоксидазы (AJ556991.1), анионной пероксидазы (TC 151917), ингибитора протеиназы (EU 293132.1), хитиназы (AB029935.1), [13] фланкирующие фрагменты ДНК размером 410, 157, 106 и 121 п.н. соответственно. Компьютерный анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы «DNASTAR, Inc» (США).

Активность оксалатоксидазы и пероксидазы определяли микрометодом в паншетах для иммуноферментного анализа по окислению ОФД в присутствии 0.0015% H₂O₂ в 0.01М ФБ. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ StatSoft (Statistica 6.0). На рисунках приведены средние результаты опыта и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что предпосевная обработка семян ХОС приводит к усилению экспрессии гена оксалатоксидазы и анионной пероксидазы как при инфицировании *B. sorokiniana*, так и *S. nodorum* (рис. 1). Следует отметить, что ХОС со СА 65% проявляли более значительный стимулирующий эффект на экспрессию генов ферментов про-/антиоксидантной системы по сравнению с ХОС со СА 30%. Так, при инфицировании *B. sorokiniana*, обработке ХОС со СА 65% экспрессия гена анионной пероксидазы через 6 сут после инокуляции усиливалась в 1,5 раза (рис. 1). Индуцирующее действие ХОС со СА 30% на экспрессию гена анионной пероксидазы в инфицированных растениях было менее значительным.

Основной функцией пероксидаз является защита растительного организма от вредного воздействия АФК и непосредственное участие в процессах дифференциации тканей и органов высших наземных растений [5]. Оксалатоксидаза участвует в деградации щавелевой кислоты, которая в патогенных системах работает в качестве эффективного фактора вирулентности [6]. Это предлагает активное участие оксалатоксидазы и пероксидазы в формировании устойчивости растений к фитопатогенам.

Важнейшими компонентами внедрения патогенных микроорганизмов в растения являются их гидролитические ферменты. В наших исследованиях ХОС со СА 30% и 65% оказывали различный индуцирующий эффект на экспрессию гена ингибитора протеиназы в патосистемах пшеница-гемибиотрофный патоген *S. nodorum* и пшеница-некротрофный патоген *B. sorokiniana* (рис. 2). Так при инфицировании *S. nodorum* более значительное влияние на транскрипционную активность гена EU 293132.1 оказывали ХОС со СА 30%. Напротив, при заражении *B. sorokiniana* более эффективными в усилении экспрессии гена ингибитора протеиназы были ХОС со СА 65%. Вероятно, в эффективной индукции ингибиторов чужеродных гидролаз могут быть задействованы ХОС различной СА. Такой механизм индукции защитного ответа ХОС мог сформироваться в процессе коэволюции.

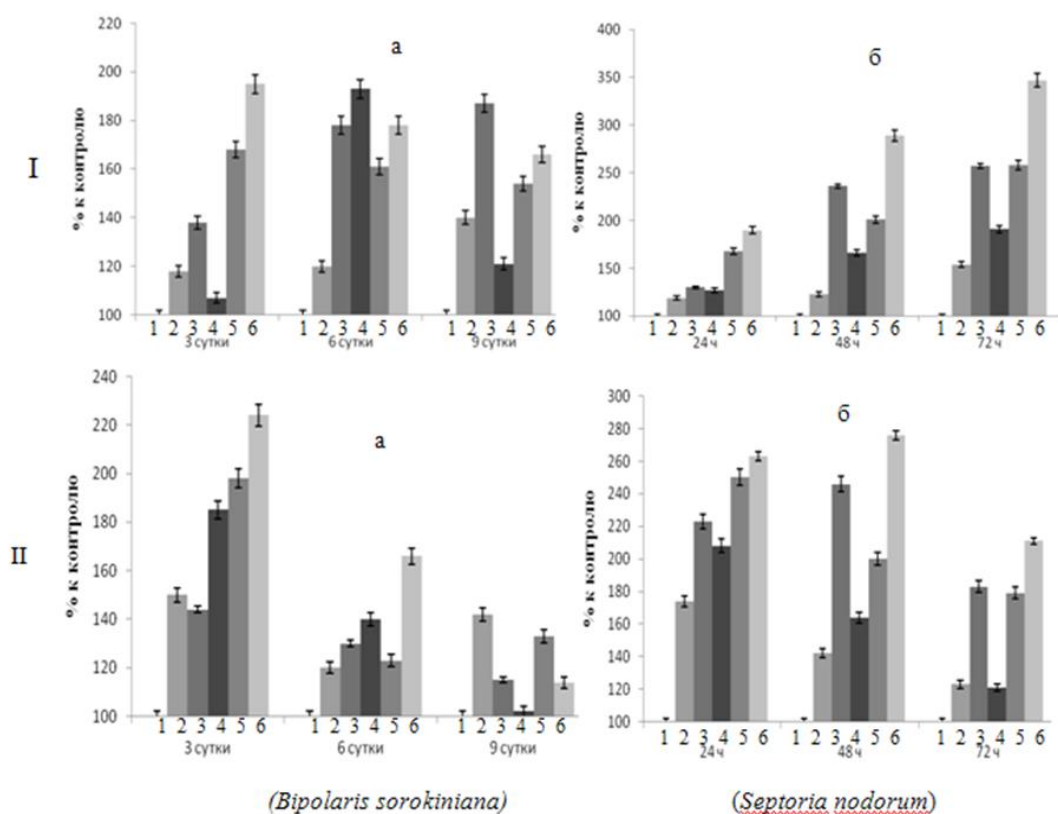


Рис. 1. Экспрессия гена оксалатоксидазы (I) и анионной пероксидазы (II) в растениях пшеницы при обработке ХОС с различной СА и инфицировании *B. sorokiniana* (а) и *S. nodorum* (б). 1 – контроль, 2 – ХОС со СА 30%, 3 – ХОС со СА 65%, 4 – инфицирование, 5 – ХОС со СА 30% + инфицирование, 6 – ХОС со СА 65% + инфицирование.

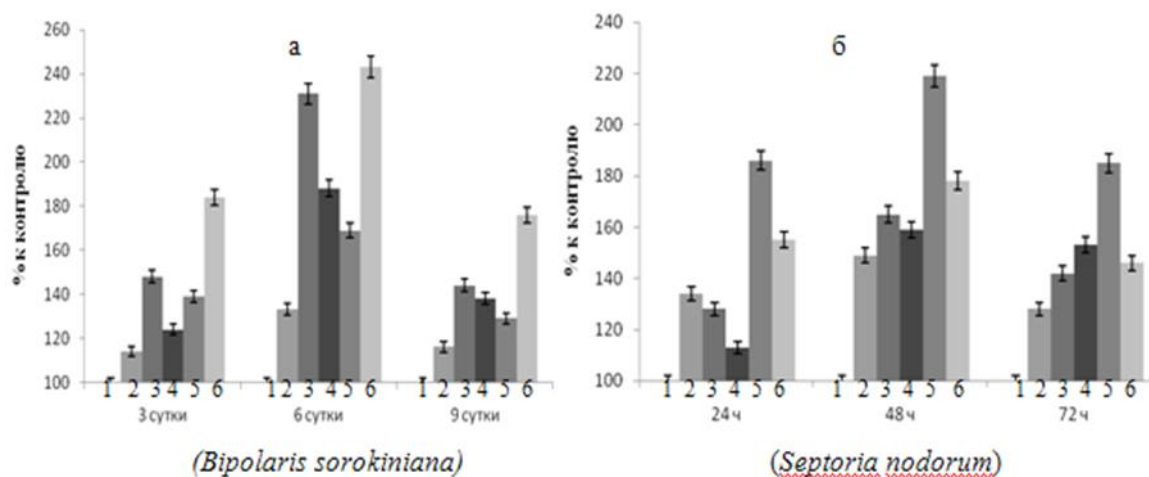


Рис. 2. Экспрессия гена ингибитора протеиназы в корнях (а) и листьях (б) пшеницы при обработке ХОС с различной СА и инфицировании *B. sorokiniana* (а) и *S. nodorum* (б). 1 – контроль, 2 – ХОС со СА 30%, 3 – ХОС со СА 65%, 4 – инфицирование, 5 – ХОС со СА 30% + инфицирование, 6 – ХОС со СА 65% + инфицирование.

Высшие растения не содержат хитин, но продуцируют белки, обладающие хитиназной активностью и гидролизующие β -1,4-связи хитина – основного структурного

компонента клеточных стенок грибов [7]. Из представленных на рис. 3 результатов видно, что экспрессия гена хитиназы возрастала под влиянием как обработки препаратами, так и инфицирования. ХОС со СА 30% и СА 65% практически в равной мере оказывали влияние на экспрессию гена хитиназы в корнях неинфицированных растений, при этом, экспрессия гена хитиназы снижалась в ходе эксперимента

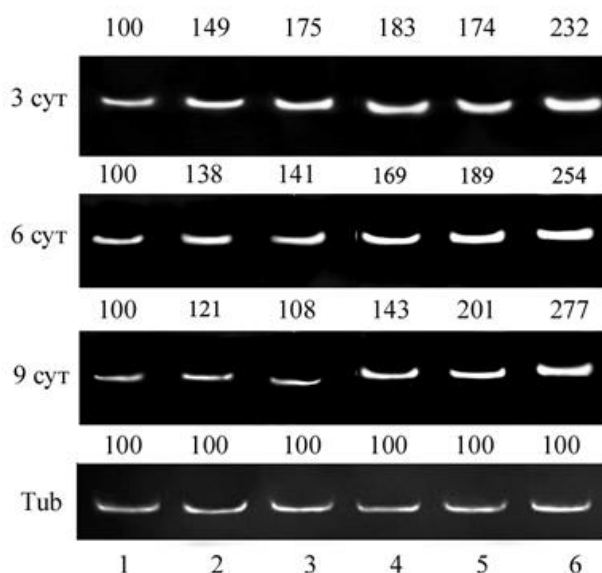


Рис. 3. Экспрессия гена хитиназы АВ029935.1 в корнях пшеницы сорта Жница при обработке ХОС с различной степенью ацетилирования и заражении *B. sorokiniana*.

1 – контроль, 2 – ХОС со СА 30%, 3 – ХОС со СА 65%, 4 – *B. sorokiniana*, 5 – ХОС со СА 30% + *B. sorokiniana*, 6 – ХОС со СА 65% + *B. sorokiniana*

Цифрами представлен нормализованный против экспрессии гена β -тубулина уровень экспрессии гена хитиназы (в % контролю)

При предобработке ХОС и инфицировании *B. sorokiniana* транскрипционная активность гена хитиназы в корнях была более значительной и продолжительной, особенно в варианте с ХОС со СА 65% (рис. 3).

Заключение

Таким образом, установлены различия в ответных реакциях растений пшеницы на инфицирование возбудителями грибных болезней различной трофности при предобработке семян ХОС в зависимости от их СА. ХОС со СА 65% более эффективно индуцировали повышение транскрипционной активности генов PR-белков при инфицировании как *S. nodorum*, так и *B. sorokiniana* по сравнению с ХОС со СА 30%. Полученные данные указывали на важную роль СА в проявлении элиситорных свойств ХОС.

Работа выполнялась при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания (№ госрегистрации 01201456414).

ЛИТЕРАТУРА

1. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. При использовании элиситоров для защиты сельскохозяйственных растений необходима осторожность // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 3. С. 322-325.
2. Silipo A., Erbs G., Shinya T., Dow J.M., Parrilli M., Lanzetta R., Shibuya N., Newmann M.-A., Molinaro A. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. // Glycobiology. 2010. V. 120. P. 406-419.
3. Davoine C., Le Deunff E., Ledger N., Avice J.C., Billard J.P., Dumas B., Huault C. Specific and constitutive expression of oxalate oxidase during the aging of leaf sheaths of ryegrass stubble // Plant Cell Environ. 2001. V. 24. P. 1033-1043.

4. Santos A., Guedarri N., Tromboto S., Moerschbacher B.M. Partially acetylated chitosan oligo- and polymers induce an oxidative burst in suspension cultured cells of the gymnosperm *Araucaria angustifolia* // *Biomacromolecules*. 2008. V. 9. P. 3411-3415.
5. Jansen M.A.K., van den Noort R.E., Tan M.Y.A., Prinsen E., Lagrimini L.M., Thornley R.N.F. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress // *Plant Physiology*. 2001. V. 126. P. 1012–1023.
6. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. // Уфа: Гилем, 2006. 232 с.
7. Koga D., Mitsutomi M., Kono M., Matsumiya M. Biochemistry of chitinase // *Chitin and Chitinases* / Ed. Jolles P., Muzzarelli R.A.A. Ancona: Atec. Grottammare. 1999. P. 111-123.

УДК 632.48:638.95.025/952

БИОДУСЛЕКТ – БИОЛОГИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ПРИ ФИТОПАТОГЕНЕЗЕ

**Ямалеева А.А.¹, Давлетбаев И.М.³, Ситдикова Г.И.¹, Набеева Р.А.¹,
Ямалеев А.М.²**

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства,

³ООО «Органик-парк», г. Казань, Россия

Известно, что арахидоновая кислота (АК) и ее эфиры обладают наибольшей специфической биологической активностью в индуцировании как защитных, так и ростовых реакций. Основные исследования в этой области направлены на изучение физико-химической природы взаимодействия паразитов с растениями, которые способны продуцировать антистрессовые метаболиты, как защитную реакцию на заболевание. Однако требуется дополнительный анализ соединений, протектантов, индуцирующих стимулирующие как защитных реакций, так и формирование продуктивности неиммунных генотипов.

Пшеница является одной из важнейших продовольственных культур, средняя урожайность которой в последние годы снижается. Одной из причин низкой продуктивности культуры являются потери, наносимые грибными болезнями. В настоящее время установлена регуляторная роль низкомолекулярных соединений в индукции генов, ответственных за формирование защитных реакций в растительном организме (2,3,6). Полученные данные о молекулярных механизмах взаимоотношения патогенов и растений позволили предложить перспективные практические направления и методы борьбы с фитопатогенами, связанные с возможностью регулирования иммунного ответа растений (1,4). Выполненные исследования еще не столько раскрыли молекулярные механизмы фитоиммунитета, сколько наметили новые подходы для изучения и разработки на этой основе новых принципов защиты растений от инфекционных бо-

лезней. Так, грибные патогены нарушают регуляторные механизмы, контролирующие биогенез хлоропластов.

Следует отметить, что антитела, полученные нами к лектинам с наночастицами металлов, специфичны и могут служить биохимическим тестом усиления иммунного ответа растений, продуцированных в тканях растения-хозяина для патогенов постинфекционных белков-лектинов.

Материалы и методы

Физиологическое состояние пшеницы оценивали современными фитопатологическими и биохимическими методами (5,7). Спектры поглощения света хлорофилл-белковыми комплексами получали на лазерном спектрофотометре Лафот 2 (ЛОМО). Опыт закладывали на делянках площадью 100 м² в четырехкратной повторности. Технология возделывания яровой пшеницы общепринятая для степной зоны Предуралья Республики Башкортостан. Исследования, направленные на изучение влияния многоцелевого регулятора роста и развития растений «Биодуслект», на хлорофилл-белковые комплексы листьев (ХБК), урожайность и качество зерна проводили в условиях полевого и лабораторного опыта по схеме:

1. Контроль без обработки.
2. Эталон Иммуноцитифит. Предпосевная обработка семян, расход препарата – 2 табл/кг, расход рабочей жидкости – 10 л/т. Опрыскивание растений в фазу кущения-выхода в трубку, расход препарата – 1 табл/50 м², расход рабочего раствора – 250-300 л/га.
3. Биодукс. Предпосевная обработка семян, расход препарата – 1,0 мл/т, расход рабочей жидкости – 10 л/т. Опрыскивание растений в фазу кущения-выхода в трубку, расход препарата – 1,0 мл/га, расход рабочего раствора – 250-300 л/га.
4. Биодуслект. Предпосевная обработка семян, расход препарата – 2,0 мл/т, расход рабочей жидкости – 10 л/т. Опрыскивание растений в фазу кущения-выхода в трубку, расход препарата – 20 мл/га, расход рабочего раствора – 250-300 л/га.

Математическая обработка данных выполнена на IBM PS в среде Microsoft office 98 в программе Excel по соответствующим алгоритмам.

Процесс получения биопрепарата Биодукс основан на культивировании низшего почвенного гриба *Mortirella alpine* F-134 на глюкозо-картофельной среде с последующим омылением и экстракцией полиненасыщенных жирных кислот, обогащенных арахидоновой кислотой (Давлетбаев, 2004). Биодуслект создан с применением лектинов клещевины и Биодукса. Препаративная форма представляет собой раствор полученного концентрата жирных кислот в этиловом спирте с добавлением антиоксиданта – аскорбиновой кислоты.

Биологическую эффективность иммунорегулятора «Биодукс» изучали в лабораторных опытах и в полевых на посевах яровой пшеницы сорта Башкирская 26 в 2012-2013 гг. в Башкирском НИИ сельского хозяйства. Почва опытного участка НП «Казангуловское» - чернозем типичный мощный тяжелосуглинистый. Содержание гумуса в пахотном слое составляет 5,8-6,0%, подвижного фосфора (по Чирикову) – 10,3-14,1%, обменного калия (по Масловой) – 16,3-18,8 мг/100 г почвы. Реакция почвенной среды нейтральная (рН 6,0-6,5). Чтобы выявить биологическую эффективность Биодукса в течение всего периода вегетации, наблюдали за ростом и развитием растений, а также фитосанитарным состоянием посевов пшеницы.

Результаты исследований

Перед закладкой опыта провели фитопатологическую экспертизу семян яровой пшеницы Башкирская 26 для выявления патогенной и сапрофитной микробиоты рулонным методом по общепринятой методике. Выделявшийся состав грибов представлен видами родов *Fusarium* sp. – фузариоз, *Macrosporium* sp. – черноватая плесень, *Alternaria tenuis* Nets. – черный зародыш, *Bipolaris sorokiniana* P., Keفر. – гельминтоспориоз. Данная группа микробиоты развивается на всходах и в период вегетации культуры на растениях пшеницы. Проведенная фитоэкспертиза дала возможность подобрать эталон - наиболее эффективный фунгицид Премис тотал, рекомендованный для борьбы с выявленными видами заболеваний, включая листостебельные болезни.

Результаты лабораторных и полевых исследований свидетельствуют о том, что иммунорегулятор Биодуслект обладает фунгицидными свойствами по отношению к патогенным грибам и одновременно оказывает иммуностимулирующее действие на растения яровой пшеницы. Обработка им семян и вегетирующих растений увеличивает всхожесть семян, силу роста, продуктивную кустистость, число зерен в колосе, урожайность и качество зерна, способствует снижению заболеваемости яровой пшеницы мучнистой росой, бурой ржавчиной и септориозом.

Многоцелевой регулятор роста Биодуслект оказывал положительное влияние на качество зерна, повышая в нем содержание сырой клейковины и белка. Так, обработка семян (1 мл/т) и двукратная посевов яровой пшеницы в фазах кущения (баковая смесь с гербицидом Метофен 0,8 л) и выхода в трубку – колошение (3 мл/га) увеличивало содержание сырой клейковины в зерне на 1,9%, а белка на 6,4%. Общая зараженность растений яровой пшеницы к концу вегетации корневыми гнилями в вариантах с обработкой семян Биодуксом снизилась на 45...60%. Применение фунгицида Премис тотал уменьшало зараженность на 70...80%.

В тоже время лабораторные опыты, проведенные рулонным методом выявили, что биопрепарат стимулирует прорастание семян, а в дальнейшем и рост проростков. Так, масса проростков, выращенных из 400 семян на 10 день после закладки опыта с использованием Биодуслекта была на 9,0-10,2 г выше, чем в варианте с использованием химического фунгицида.

Результаты испытания Биодуслекта в полевых опытах в борьбе с листостебельными заболеваниями пшеницы свидетельствуют о высокой его биологической эффективности по сдерживанию грибных болезней в фазах кущение – выход в трубку и молочно-восковой спелости. Препарат Биодукс обеспечивал лучший рост и развитие растений яровой пшеницы. Испытываемый регулятор роста оказал существенное влияние на формирование структурных элементов урожая, увеличивал продуктивную кустистость (1,58-1,81, в контроле – 1,08), озерненность колоса (17,8-20,5 зерен в колосе, в контроле – 16,0) и массу 1000 зерен (29,3-32,6 г, в контроле – 28,8 г). Урожайность яровой пшеницы повышалась на 1,8-2,4 ц/га при обработке семян, на 3,5-4,8 ц/га при комплексной обработке, т.е. включая обработки по вегетации. Применяемый регулятор роста оказал существенное влияние на качество зерна. В зерне выросло содержание сухого вещества, белка клейковины, ИДК. Самые высокие значения рассматриваемых показателей качества зерна отмечены в варианте с Биодуксом.

Известно, что при взаимодействии паразитов с высшими растениями последние способны продуцировать антистрессовые метаболиты, как защитную реакцию на заболевание. При этом в качестве стимуляторов защитных свойств во многих растениях могут выступать некоторые жирные кислоты, из которых арахидоновая кислота и ее эфи-

ры обладают наибольшей специфической биологической активностью в индуцировании как защитных, так и ростовых реакции.

Изучение механизма действия Биодукса имеет важное значение для поиска новых более эффективных и менее загрязняющих окружающую среду биологических средств защиты растений от болезней. Одним из важных инструментов изучения механизма действия Биодукса является оптическое изучение ХБК. Показано, что Биодукс играет определенную роль в увеличении Аб, % света ХБК листьев, содержание и гемагглютинирующую активность лектинов, влияющих на биологическую активность растений по отношению к грибным патогенам. Арахидоновая кислота Биодукса взаимодействует с мембранами хлоропластов растений, что говорит о роли АК в молекулярных механизмах индуцирования устойчивости.

В Республике Башкортостан налажено оригинальное производство многоцелевого стимулятора роста растений «Биодукс», предназначенного для регуляции роста и защиты и повышения устойчивости растений к грибным болезням.

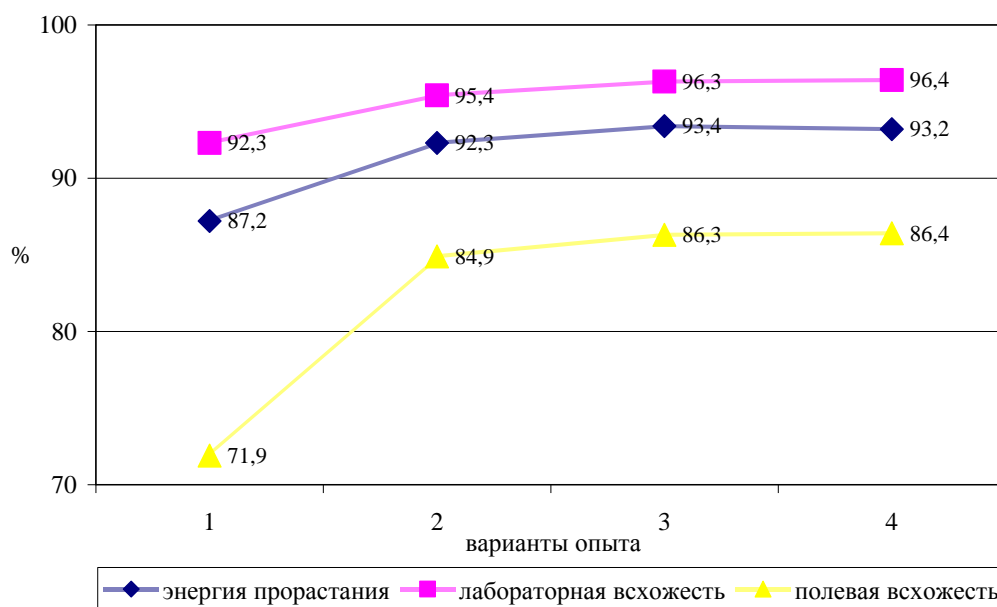


Рис. 1. Влияние иммунорегулятора «Биодуслект» на всхожесть и энергию прорастания семян яровой пшеницы.

Культурные формы растений отличаются, как правило, сильно ослабленными иммуногенетическими свойствами. При использовании индукторов устойчивости растения активизируют продуцирование физиологически активных веществ. Регуляторы роста интенсивно включаются в процессы метаболизма и быстро транспортируются в растениях.

Использование нами баковой смеси гербицида Чисталан экстра и биорегулятора Биодуслект снижало отрицательное действие гербицида и стимулировало в клетках обработанных растений обмен белков, гемагглютинирующую активность лектинов, возрастала функциональная активность ДНК, т.е. повышается неспецифическая устойчивость растений к гербициду. Было установлено, что повторная обработка многоцелевым иммуностимулятором Биодуслект растений пшеницы в фазе флаг-листа является важным способом дополнительного повышения устойчивости растений пшеницы к грибным болезням и урожайности культуры.

Заключение

В плане практической реализации теоретических разработок в области биотехнологии, с привлечением высокоточных нанотехнологических методов, на основе веществ природного происхождения нами создан регулятор роста растений «Биодуслект» для управления ростовыми процессами, устойчивости растений к биогенным и абиогенным факторам.

Таким образом, включение защитных механизмов растения не обязательно вызывается патогеном, может происходить под воздействием лектинов растений и метаболитов микроскопических грибов. В качестве индукторов могут выступать соединения, обнаруженные в самих фитопатогенных микроорганизмах, но отсутствующие в растениях – сигнальные молекулы. Они позволяют индуцировать у растений комплексную неспецифическую устойчивость ко многим болезням грибного, бактериального и вирусного происхождения. Одним из таких препаратов, содержащих вещество природного происхождения – арахидоновую кислоту, является многоцелевой стимулятор защитных реакций, роста и развития растений Биодукс. При обработке семян Биодуслектом ускоряется всхожесть растений, возрастает кустистость и листовая поверхность, стимулируются процессы корнеобразования, повышается озерненность колоса и масса зерна, активизируются физиологические и биохимические процессы, раневой репарации.

Показано, что при опрыскивании вегетирующих растений пшеницы водным раствором Биодуслекта, микронные дозы препарата вызывают в них мобилизующий стресс, вследствие которого повышается иммунная устойчивость растений к неблагоприятным воздействиям, угнетению гербицидами и повреждению, вызываемому различными факторами, повышается химическая устойчивость, засухоустойчивость растений. Выявлена возможность совместного применения Биодуслекта и гербицида с целью снижения фитотоксичности последнего, повышения урожайности культуры и экологизации использования пестицидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шпаар Д. Устойчивость растений. Защита растений, 2004, 6: 10-12.
2. Евстигнеева Т.А., Тютюрев С. Л. Эффективность хитозара против болезней и физиологических стрессов растений. В сб.: Фитосанитарное оздоровление экосистем. Мат. съезда, т. II. СПб, 2005: 281-283.
3. Ямалеев А.М., Сахибгареев А.А., Ямалеева А.А., Ибрагимов Р.И./Агробиохимические аспекты фитоиммунитета и защиты растений. Уфа, 2014.-423с.
4. Ямалеева А.А., Кузнецов В.Г., Ямалеев А.М. Физиолого-биохимическое изучение влияния на растения и эффективность применения композиций Гуми-90 с пестицидами на посевах пшеницы, ячменя, гороха и картофеля. Вест. РАСХН, 2005, 3: 321-322.
5. Ямалеева А.А. Лектины растений и их биологическая роль. 2001.
6. Corbett J.R., Wright K., Baillie A.C. The biochemical mode of action of pesticides. 2nd edition. L. et al.: Academic Press, 1984. P. 382.
7. Lisker J.S. Automatic control of food and biological processes. – Paris: Elsevier. – 1994.

Научное издание

БИОТЕХНОЛОГИЯ – ОТ НАУКИ К ПРАКТИКЕ

Сборник материалов
Всероссийской конференции с международным участием,
посвященной памяти профессора Киреевой Наири Ахняфовны.
В двух томах. Том 1

(г. Уфа, 23-26 сентября 2014 года)

Статьи публикуются в авторской редакции

Лицензия на издательскую деятельность
ЛР № 021319 от 05.01.99 г.

Подписано в печать 15.09.2014 г. Формат 60x84/16.
Усл. печ.л.12,30. Уч.-изд.л. 12,84
Изд. № 208. Заказ 395.

Редакционно-издательский центр
Башкирского государственного университета
450076, РБ, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.