

Биология

УДК 631.531.027.2; 631.811.98

Л. Е. ТОНОЯН, М. Т. ПЕТРОСЯН, К. Г. АЗАРЯН, Ю. Г. ПОПОВ

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕЛАНИНА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ
ОГУРЦА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И *IN VIVO*

В Институте биотехнологии Армении на базе промышленного штамма *Bacillus thuringiensis*, используемого в производстве бактериальных инсектицидов, получен мутантный штамм – продуцент водорастворимого меланина. Выявлено стимулирующее влияние препарата бактериального меланина (Btm) на рост, развитие и плодоношение огурца как в культуре *in vitro*, так и *in vivo*.

Введение. Меланины широко распространены в природе и обуславливают цветовое разнообразие живых организмов. Различают меланины микробного, животного и растительного происхождения. Они имеют высокую физиологическую активность, которая проявляется в противовоспалительных, антиоксидантных, антиопухолевых, фотопротекторных, фитостимулирующих и других свойствах, чем обусловлено их применение в медицине, фармацевтике, косметологии и других областях [1–4]. Однако, несмотря на полифункциональность, применение меланинов ограничивается сложностью их выделения из биологических объектов, очистки от белковых примесей, а также дороговизной получения синтетических аналогов. Поэтому появление любого вещества, сходного по своим свойствам с меланинами, сразу привлекает интерес ученых и практиков с точки зрения получения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции.

В Институте биотехнологии РА на базе производственного штамма *Bacillus thuringiensis* под действием нитрозогуанидина получен меланиногенный штамм, который, сохраняя инсектицидную активность, оказался продуцентом темно-коричневого водорастворимого пигмента, выделяемого в культуральную жидкость [5]. Физико-химическими исследованиями было установлено, что этот пигмент является меланином [6].

Еще до установления идентичности выделяемого мутантным штаммом пигмента с меланином были начаты исследования по изучению его физиологической активности. Предварительные испытания культуральной жидкости выявили ее способность стимулировать рост и развитие растений, что обуславливает необходимость более детальных исследований. С 1997 г. на кафедре микробиологии, биотехнологии растений и микроорганизмов ЕГУ проводятся исследования по изучению влияния полученного бактериального мела-

нина (Vtm) на различные сельскохозяйственные культуры в условиях *in vitro* и *in vivo* [1]. Следует отметить, что Vtm оказывает стимулирующее влияние также на рост и развитие многих декоративных культур [7]. В настоящей работе представлены исследования, проведенные на культуре огурца.

Среди овощных культур огурец занимает важное место. Его широкое применение в рационе питания человека, длительный период плодоношения, легкость выращивания в культуре *in vitro* обусловили выбор огурца в качестве модельной культуры для выявления механизма действия Vtm на растения.

Результаты исследований растений, выращенных на среде с Vtm, были проверены в опытах на интактных растениях как в оранжерее, так и в поле, ибо применение водорастворимого природного стимулятора роста растений в разных отраслях растениеводства представляет большой интерес с точки зрения получения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции.

Материал и методика. Опыты проводили в лаборатории, оранжерее и в полевых условиях на огурце сорта Манэ. Оптимизация состава питательных сред является одним из условий успешного выращивания изолированных тканей и органов любой культуры. Растения огурца получали из стерильных семян по общепринятой методике [8]. Семена выращивали в асептических условиях на среде Ковровцевой. После появления 1–2 листьев ростки пересаживали на разные модифицированные среды Мурасиге-Скуга (МС) [9], варьируя концентрации и комбинации гормональных и трофических факторов. Для формирования и роста корней и листьев оптимальной оказалась среда МС с добавлением только 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты. Пробирочные растения были получены в течение 20–25 дней. Рост стерильных растений на данной среде поддерживали путем черенкования. Полученные мериклоны выращивали в термокамере при 26⁰С и 16-часовом освещении интенсивностью 1000 лк. Эти растения служили исходным материалом для исследования влияния меланина. Для стимуляции роста в среду добавляли Vtm в концентрации 0,025 и 0,016%. Учет ростовых показателей мериклонов проводили на 10, 20 и 30-е сутки культивирования. Анатомические исследования проводили на срезах третьего междоузлия стеблей огурца, которые окрашивались водным раствором сафранина, после чего срезы для просветления помещали в глицерин на 1–3 суток. Постоянные препараты готовили заключением срезов в глицерин-желатин. Отдельные анатомические элементы стебля и корня измеряли при помощи окуляр-микрометра МОВ 1–15х. Измерения проводили на 20 срезах, результаты подвергали статистической обработке.

В условиях *in vivo* обработка Vtm проводилась тремя способами: вариант 1 – замачивание семян; вариант 2 – замачивание семян+полив почвы в фазе вегетации; вариант 3 – замачивание семян+поливы почвы в фазе вегетации и в начале цветения. В предварительных экспериментах из шести испытанных концентраций Vtm (0,02–0,07%) выбрали наиболее эффективную концентрацию 0,025%. По ходу опыта проводились биометрические и биохимические исследования, определялась урожайность и семенная продуктивность плодов первого сбора, оставленных в качестве семенников до конца вегетации. Полевые исследования проводили на 50–100 растениях огурца. Определение площади листовой пластинки контрольных и опытных растений проводили весовым методом [10].

Результаты и обсуждение. Изучение влияния Vtm на ризогенез микрочеренков и рост мериклонов огурца показало, что при добавлении Vtm наблюдается ранняя инициация ризогенеза и интенсивный рост корней как в длину, так и в толщину. В результате уже на 10-е сутки культивирования формировались удлиненные и утолщенные корни (табл. 1), что свидетельствует о начале вторичного роста корней, то есть об ауксиноподобном действии Vtm на камбиальную активность корня.

Vtm ускорял также рост побегов мериклонов огурца. Стимуляция роста стебля наблюдалась в течение всего периода культивирования (рис. 1).

Таблица 1

Влияние Vtm на рост мериклонов огурца

Дни культивирования	Длина корней, см		Длина стеблей, см	
	контроль	Vtm	контроль	Vtm
10	0,6	1,2	3,5	4,0
20	3,0	4,5	6,0	7,0
30	6,0	7,5	10	13

Определение площади третьего листа мериклонов показало, что у опытных растений она достигает $6,74 \text{ см}^2$, в то время как у контрольных – лишь $2,89 \text{ см}^2$. Листья опытных растений отличались также и толщиной жилок, что в сочетании с разрастанием листовых пластинок свидетельствует о стимуляции деятельности маргинальной меристемы, ответственной за рост листьев.



Рис. 1. Влияние меланина на рост и корнеобразование микрочеренков огурца (1 – контроль, 2 – меланин) при добавлении 0,025% меланина.

А в полевых опытах в разные годы этот показатель у пятого листа возрастал по сравнению с контролем на 16–24%. Определение массы свежих и сухих листьев мериклонов выявило аналогичное стимулирующее влияние Vtm и на массу листьев: сырой вес листьев контрольного растения 420 мг, а обработанного Vtm – 620 мг; сухой вес – 43 и 53 мг соответственно. Таким образом, по сырой массе листья опытных растений превосходили контроль на 48%, а по сухой массе – на 23%. Аналогичная картина наблюдалась и в полевых опытах.

Выращенные на среде с Vtm мериклоны характеризуются также пролонгированным ростом. У контрольных растений листья желтели через 1,5 месяца, в то время как на среде с Vtm они оставались темно-зелеными в течение трех месяцев культивирования.

Анатомические исследования элементов стебля также выявили активацию меристематической деятельности под влиянием Btm: диаметр сосудов ксилемы у опытных растений вдвое больше, чем у контрольных. Таким образом, меланин стимулирует камбиальную активность, за счет чего и утолщается слой ксилемы. Подобные вторичные изменения наблюдаются под влиянием ауксинов.

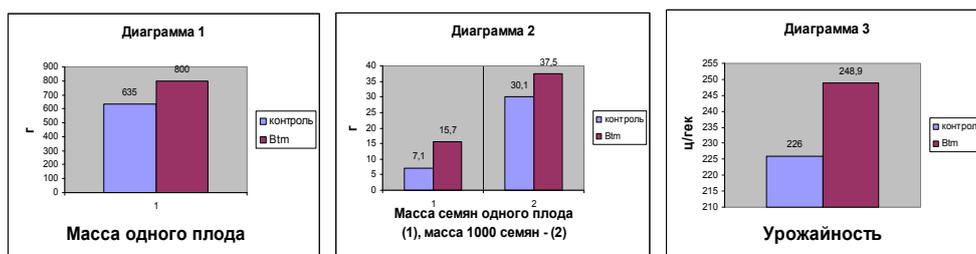
Стимулирующий эффект Btm наблюдался и в опытах *in vivo*. Во всех вариантах опытов препарат повышал всхожесть семян, ускорял рост как побегов, так и корневой системы растений. Стимулировалось также цветение и плодообразование, последнее продлевалось за счет его раннего начала и позднего завершения. Особенно эффективно Btm влиял на развитие корневой системы. Наибольший эффект получен в варианте предпосевного замачивания семян и двух поливов – в фазе вегетации и в начале цветения (вариант 3). У обработанных Btm растений варианта 1 по сравнению с контролем наблюдалась ранняя инициация ризогенеза, разрастание корневой системы за счет интенсивного образования боковых и придаточных корней, что свидетельствует об ауксиноподобном действии Btm. У растений варианта 3 корневая система плодоносящих растений уже сформирована, всасывающая поверхность больше и, следовательно, наблюдаемый эффект от применения Btm проявляется сильнее, чем в вариантах 1 и 2. Растения варианта 3 превосходили контроль по длине стебля на 18,3%, ассимиляционной поверхности листьев – на 9,5%, а также по биохимическим показателям: по содержанию сухих веществ – на 9,1%, сахаров – 21,2%, витамина С – 16,2%. Морфологический анализ плодов-семенников огурца, проведенный в фазе биологической спелости, показал, что Btm значительно повышал также и семенную продуктивность (табл. 2, диагр. 1, 2, 3).

Таблица 2

Влияние Btm на урожайность и семенную продуктивность огурца сорта Манэ

Варианты опыта	Плоды		Семена 1 плода	
	ц/га	масса 1 плода, г	число, шт.	масса, г
контроль	226,2	635	236	7,1
вариант 3	248,9	800	428	15,7

Повышение семенной продуктивности проявлялось по ряду показателей: число семян в 1 плоде-семеннике доходило до 428 шт. при 230 в контроле (рис. 2). Средняя масса контрольного плода-семенника не превышала 635 г, а у опытных плодов в варианте 3 этот показатель доходил до 800 г (диагр. 1).



Стимуляция роста и развития обработанных Vtm растений в значительной мере зависит от климатических условий, особенно от обеспеченности водой, что обусловлено высоким содержанием воды в плодах огурца. В сухую погоду более эффективна двукратная обработка препаратом, ибо при

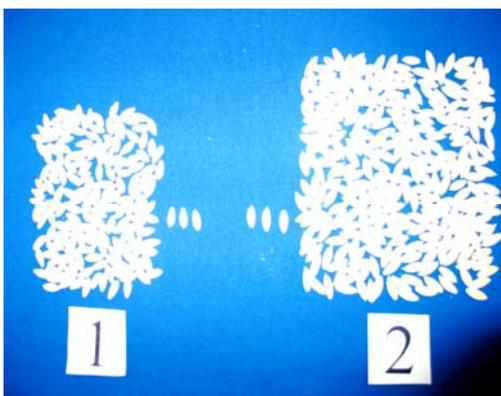


Рис. 2. Количество семян из одного плода-семенника огурца: 1 – контроль, 2 – вариант 3.

поливе Vtm развитая корневая система поглощает больше препарата и корнеобразование усиливается, что увеличивает поглощение минеральных веществ и воды, особенно нужных для роста сочных плодов огурца. За 4 года испытаний препарата опытные растения обычно обеспечивали 1 дополнительный съём плодов, а прибавка урожая в пересчете на гектар составляла от 10 до 19%.

Таким образом, бактериальный меланин оказывает стимулирующее действие на рост, развитие и урожайность всего растения. По-

добный эффект от Vtm, возможно, обусловлен усиленным развитием корневой системы, что, в свою очередь, активирует рост и развитие надземной части и ускоряет формирование генеративных органов, обеспечивая прибавку урожая у обработанных растений. Исходя из полученных результатов можно предположить, что Vtm проявляет ауксиноподобное влияние, ибо во всех опытах препарат стимулировал процессы, регулируемые эндогенными гормонами – ауксинами[11]. Некоторое разрастание листовых пластинок опытных растений и повышение содержания хлорофилла в листьях способствует снабжению большего числа завязавшихся плодов фотоассимилятами и улучшению товарных качеств выращиваемой продукции. Vtm также повышает устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды и увеличивает продолжительность онтогенеза опытных растений.

Кафедра микробиологии, биотехнологии растений и микроорганизмов

Поступила 15.05.2009

ЛИТЕРАТУРА

1. Азарян К.Г., Попов Ю.Г., Петросян М.Т., Овсепян А.С., Агаджанян А.Е. Бактериальный меланин – универсальный биостимулятор. Межд. конф. “Соврем. сост. биотехн. в Армении и роль МНТЦ в ее развитии”. 2008, с. 203.
2. Барабой В.А. Укр. биох. ж., 1999, т. 71, № 4, с. 5–14.
3. Барабой В.А. Успехи совр. биол., 2001, т. 121, № 1, с. 36–46.
4. Боршевская М.И., Васильева С.М. Вопр. мед. химии, 1999, № 1, с. 1–12.
5. Karabekov B.P. Mutation Influence on Pigment Formation in *Bacillus thuringiensis*. Reports of Soviet-Amer. Conf. “Genetics of *Actinomycetes* and *Bacillus*”. 1978, p. 242–248.
6. Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S. Asaturyan R.A., Vardanyan A.A. and Saghyan A.S. Pigm. Cell Research, 2005, v. 18, p. 130–135.

7. **Азарян К.Г., Петросян М.Т., Палазян Т.Н., Гандилян Р.А.** Известия ГАУА, 2007, № 4, с. 5–8.
8. **Бутенко Р.Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964, 272 с.
9. **Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е.** Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980, 488 с.
10. **Сказкин Ф.А., Ловчиновская Е.И., Миллер М.С., Аникиев В.В.** Практикум по физиологии растений. М., 1958, с. 75–76.
11. **Тоноян Л.Е., Petrosyan M.T., Popov Yu.G., Xachvanqyan G.Yu., Ginosyan A.G.** The Study of Bacterial Melanin Influence. XXXVIII ESNA Annual Meeting: “New Methods in Agricultural Improvement and Hazard Assessment”, 2008, p. 185.

Լ. Ե. ՏՈՆՈՅԱՆ, Մ. Թ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Կ. Գ. ԱԶԱՐՅԱՆ, ՅՈՒ. Գ. ՊՈՊՈՎ

ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ՄԵԼԱՆԻՆԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՎԱՐՈՒՆԳԻ ԱՃՍԱՆ ԵՎ ԶԱՐԳԱՅՄԱՆ ՎՐԱ *IN VITRO* ԵՎ *IN VIVO* ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո մ

ՀՀ Կենսատեխնոլոգիայի ինստիտուտում *Bacillus thuringiensis* արտադրական շտամի հիման վրա, որն օգտագործվում է մանրէաբանական միջատասպան պատրաստուկների արտադրության մեջ, ստացվել է ջրալուծ մելանին արտադրող մուտանտ շտամ: Բացահայտվել է բակտերիալ մելանինի պատրաստուկի խթանիչ ազդեցությունը վարունգի աճման, զարգացման վրա ինչպես *in vitro*, այնպես էլ *in vivo* պայմաններում:

L. E. TONROYAN, M. T. PETROSYAN, K. G. AZARYAN, Yu. G. POPOV

INFLUENCE OF BACTERIAL MELANIN ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF CUCUMBER BOTH *IN VITRO* AND *IN VIVO* CONDITIONS

Summary

At the Institute of Biotechnology RA on the basis of industrial strain *Bacillus thuringiensis*, which is used in the production of bacterial insecticides, mutant strain was obtained – the producer of water-soluble melanin. The stimulating influence of bacterial melanin preparation was revealed on the growth and development of cucumber both *in vitro* and *in vivo* conditions.