



МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕСА

МАТЕРИАЛЫ

**Международной школы конференции молодых учёных,
посвященной 80-летию Брянской государственной инженерно-
технологической академии и профессору В.П. Тимофееву**

(12-18 сентября 2011 года)

Издательство Московского государственного университета леса

Москва – 2011

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПОСЕВНЫЕ КАЧЕСТВА СЕМЯН СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Королев А.В.¹, Иванов Ю.В.^{1,2}, Филиппова О.И.^{1,3}, Куликова Н.А.^{1,3,4}

¹ООО «Велес», г. Москва,

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва,

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

⁴Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия.

E-mail: dukiu1488@mail.ru.

Ключевые слова: бактериальные препараты, посевные качества, биотестирование, проростки, сосна обыкновенная.

Одной из актуальных задач лесного хозяйства является сохранение и повышение посевных качеств семян хозяйственно ценных хвойных пород. Особенно остро эта проблема стоит для культур, характеризующихся периодичностью семеношения, когда урожайные годы сменяются годами небольших урожаев или полных неурожаев. Одним из наиболее ярких примеров такой культуры является сосна обыкновенная *Pinus silvestris* L., средняя периодичность семенных лет для которой составляет 3-4 года. При этом сосна дает ежегодно в среднем только 500-700 тыс. семян на гектар, что почти вдвое меньше ели и во много раз меньше лиственницы. В связи с этим возникает необходимость в создании резерва семян сосны. В процессе хранения снижаются посевные качества семян, причем не только в силу физиологических причин, но и в результате развития патогенной микрофлоры. Поэтому особую важность в последние годы приобретает проблема создания биопрепаратов, обладающих выраженным защитным действием, направленным против различных болезней и вредителей семян. В лесном хозяйстве использование защитных биопрепаратов пока еще не нашло столь широкого распространения. Это связано, прежде всего, с отсутствием систематических исследований, направленных на оценку и установление природы защитного действия биопрепаратов.

Целью нашей работы было исследование влияния бактерий рода *Bacillus* — *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* — на посевные качества семян сосны обыкновенной. Установлено, что зависимости доза-эффект при обработке семян сосны бактериальными препаратами на основе данных видов бацилл имеют сложный характер, однако при определенных сочетаниях их дозы и времени экспозиции можно говорить о положительном влиянии штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* на посевные качества семян сосны обыкновенной. В частности, наибольший эффект от обработки штаммом *B. subtilis* наблюдали при экспозиции 2 ч и концентрации $0,002-0,004$ ($5,40 \times 10^4-1,08 \times 10^5$ кл/мл), а при обработке штаммом *B. amyloliquefaciens* — при концентрации $0,02$ ($5,40 \times 10^5$ кл/мл) и времени экспозиции 4 ч.

Учет длины проростков сосны обыкновенной, проведенный на 5-ый день проращивания, показал, что при всех исследованных временах экспозиции оба исследованных бактериальных штамма в низких концентрациях (менее $5,40 \times 10^5$ кл/мл) стимулируют рост проростков сосны.

Применение *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* снижает зарастание семян сосны обыкновенной, а применение *B. subtilis* в максимальной исследованной концентрации $2,7 \times 10^7$ кл/мл позволяет избежать зарастания семян.

На основе полученных данных установлено, что для улучшения посевных качеств семян сосны обыкновенной следует проводить их обработку бактериальными препаратами на основе *B. subtilis* и

B. Amyloliquefaciens, причем рабочая концентрация препаратов должна составлять 10^4 - 10^5 кл/мл, а время обработки не должно превышать 2-4 ч.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2028 от 11 февраля 2011 г.).

THE EFFECT OF BACTERIAL PREPARATIONS ON SOWING QUALITIES OF *PINUS SYLVESTRIS* SEEDS

Korolev A.V.¹, Ivanov Yu.V.^{1,2}, Phylippova O.I.^{1,3}, Kulikova N.A.^{1,3,4}

¹ «Veles» Ltd., Moscow,

² K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow,

³ M.V. Lomonosov Moscow State University,

⁴ A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia.

E-mail: dukuu1488@mail.ru.

Key words bacterial preparations, sowing qualities, biotesting, seedlings, *Pinus sylvestris*.

Preservation of conifers seeds during storage and optimization of their characteristics, remains an important task of the forest enterprise. This problem even vexed if cone crop changes periodically: years with “good” cone crop change years with “bad” or “excellent” cone crops. For instance, *Pinus silvestris* L. has 3-4 yielding year cycles. The average yield is about 500,000-700,000 seeds per hectare, which is about 2 times less than spruce seeds yield and sufficiently less than larch seeds yield. This makes desirable a creation of seed stocks. In the same time, long storage affects the seed viability by natural causes and action of pathogenic microorganisms. Thereby, this brings up the necessity of biopreparations searching, targeting microorganisms and seedworms. Unfortunately, this kind of biopreparations is not yet abundant in forest enterprises due to a lack of regular studies aiming their action mechanisms.

Aim of this study was to investigate how the metabolites produced by *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* influence on *Pinus silvestris* L. seeds viability.

We discovered that *Pinus silvestris* L. seeds treatment with bacteria produced complex dose-effect curves. However, data generated for certain combinations of dose and time suggested a positive influence of *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* on the seeds viability. Particularly, maximal protective effect was observed after 2h of applying *B. subtilis* with the concentration 0.002-0.004 (5.40×10^4 - 1.08×10^5 cells/ml) and in 4h after applying *B. amyloliquefaciens* with the concentration 0.02 (5.40×10^5 cells/ml). Germs length measured at the 5th day since the treatment suggested that both bacterial strains stimulated their growth at low concentrations ($< 5.40 \times 10^5$ cells/ml) at all tested exposures. Moreover, treatment with *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* decreased seed infection and

B. subtilis applied at the maximal concentration (2.7×10^7 cells/ml) prevented pathogenic seed damage.

The data suggested that seeds treatment with biopreparations, obtained from *B. subtilis* and *B. Amyloliquefaciens* improves seed viability. Their use rates fall in the range 10^4 - 10^5 cells/ml and treatment time not exceed 2-4 h.

This work was supported by Russian Ministry of Science and Education (GK #16.512.11.2028 from February 11, 2011).

НОВАЯ КСИЛАЗА МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM CANESCENS*

Логинов Д.С., Майсурадзе И.Г., Чулкин А.М., Королева О.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия.

E-mail: d.s.loginov@inbi.ras.ru.

Гемипеллюлозы являются одним из наиболее распространенных возобновляемых полисахаридов на Земле и составляют в среднем около 20% растительной клеточной стенки. Наиболее распространены среди гемипеллюлоз ксиланы. Гемипеллюлозы и лигнин образуют защитную оболочку вокруг целлюлозы. Для эффективной деградации данного комплекса необходимо наличие сложного ферментативного комплекса, в котором ксиланазы играют одну из ключевых ролей. Ксиланазы – это О-гликозид-гидролазы, катализирующие гидролиз 1,4-β-ксилозидной связи по эндодеполимеразному механизму и участвующие в процессе биодеградации гемипеллюлоз (ксиланов). В геноме грибов, продуцентов ксиланаз, показано наличие нескольких генов, кодирующих ксиланазы, относящихся к различным семействам гликозилгидролаз. Большинство из них синтезируются в минорных количествах и вопрос об их физиологической роли остается открытым. Поэтому целью данной работы являлось исследование роли ксиланазы *xylC* гриба *Penicillium canescens*, не синтезирующейся грибом в существенном количестве при глубинном культивировании.

Для достижения поставленной цели с помощью гомологичной экспрессии был получен штамм *P. canescens* – продуцент ксиланазы *xylC*. Изучение свойств исследуемого фермента проводили на гомогенном препарате фермента (электрофоретическая чистота > 90%). Молекулярная масса ксиланазы *xylC* составила 25 кДа. Максимальную активность исследуемый фермент проявлял при pH 5.0 и температуре 50°C. Значения K_m и V_m при гидролизе ксилана березы составили 1.34 г/л и 8.2 мМ/(мг·сек) соответственно. Период полуинактивации ксиланазы *xylC* составил 25 мин при 50°C. Исследование процесса денатурации *xylC* методом ДСК показало, что плавление белковой глобулы происходило при температуре 53°C. Полученные данные свидетельствуют о схожести