

# ГИББЕРЕЛЛИНЫ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AURANTIACA*: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ И ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОДУЦЕНТОВ ФИТОГОРМОНОВ

И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

## Введение

Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*) являются потенциальными объектами агробиотехнологии для разработки на их основе биологических средств как для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов, так и стимуляции роста и повышения продуктивности растений. Известно, что защитные свойства ризосферных бактерий обусловлены синтезом антибиотиков (феназинов, пирролнитрина, 2,4-диацетилфлороглюцинола, пиолотеорина и ряда других) и сидерофоров, а также индукцией системной устойчивости растений к патогенам [1, 2]. Недавно нами был описан новый штамм ризосферных бактерий *P. aurantiaca* В-162, антагонистическая активность которого по отношению к возбудителям болезней сельскохозяйственных культур связана с синтезом антибиотиков феназинового ряда и пирролнитрина [3, 4]. Кроме того, было установлено, что бактерии изучаемого штамма обладают выраженной способностью стимулировать рост и развитие растений [5], однако природа этого явления изучена не была.

Известно, что стимуляция роста растений ризосферными бактериями обусловлена синтезом индолилуксусной кислоты, гиббереллинов, цитокининов, витаминов; улучшением фосфорного питания растений путем перевода фосфатов в растворимые соединения; фиксацией атмосферного азота; деструкцией растительного гормона старения – этилена и индукцией устойчивости растений к абиотическим факторам [6-10].

Синтезируемые бактериями фитогормоны могут регулировать многие процессы жизнедеятельности растений: прорастание семян, рост, дифференциацию тканей и органов, цветение, созревание плодов и т.д. Широкое применение в сельском хозяйстве нашли препараты, содержащие гиббереллины, которые используют для стимуляции прорастания семян и повышения их всхожести, усиления роста растения путем активации апикальных и интеркалярных (вставочных) меристем; индукции их раннего цветения и завязывания плодов. Интересным является практическое использование гиббереллинов для стимуляции роста и нарушения покоя сеянцев древесных растений в питомниках. Гибберелловая кислота используется для повышения урожайности кишмишных сортов винограда и цитрусовых, увеличения вегетативной массы в луговодстве; обработка гиббереллином стимулирует рост побегов чайного куста и повышает в листьях содержание танина. Гиббереллины применяют в картофелеводстве, там, где практикуются вторичные (летние) посадки картофеля, поскольку предпосевная обработка клубней такими препаратами может ускорять появление всходов и увеличивать количество проросших глазков [11].

Согласно литературным данным синтез гиббереллинов у растений и низших грибов подвержен ингибированию соединениями, являющимися ретардантами роста растений: ССС (2-хлорэтил)триметил аммоний хлорид), АМО-1618 (2-изопропил-4-диметиламин-5-метилфенил-1-пиперидин карбоксилат метилхлорид), анцимидоа ( -циклопропил- $\alpha$ -( $p$ -метоксифенил)-5-пиримидин метил этанол), А1аg (сукцинат-2,2-диметилгидразид), Polaris (N,N-бис(фосфонометид)глицин) и т.д. [12–16].

Нами было сделано предположение, что использование токсических аналогов гормонов роста растений в качестве селективирующих факторов позволит отобрать мутантные штаммы бактерий, способные к сверхсинтезу гиббереллинов. Целью работы являлось выделение, идентификация и изучение биологической активности гиббереллинов, синтезируемых бактериями *P. aurantiaca* В-162, получение регуляторных

мутантов, способных к сверхпродукции указанных соединений и изучение их стимулирующей рост растений активности.

### Методы исследования

Бактерии выращивали в 250-мл колбах, содержащих 50 мл среды M9 [76] при 28°C в темноте в течение 48 ч. Выделение гиббереллинов осуществляли согласно [18], а разделение различных форм этих гормонов – с помощью ТСХ по методике, предложенной J. MacMillan [19]. Концентрацию гиббереллинов, синтезируемых бактериями, определяли флуориметрически (испускание 464 нм и возбуждение 406 нм) [20]. Биологическую активность гиббереллинов – с помощью биотеста на растениях латука *Lattuca sativa* [21].

Идентификацию гибберелловой кислоты осуществляли с помощью жидкостного хроматографа с масс-спектрометрическим детектором LCMS-QP8000α (“Shimadzu” Japan). Аликвоту образца объемом 10 мкл наносили на обратнофазную колонку Restec Allure C18 (150×4,6 мм; 5 мкм; 60 Å). Элюцию осуществляли со скоростью 0,4 мл/мин при 40°C мобильной фазой, содержащей метанол и 0,1%-ную уксусную кислоту. В течение первых 7 мин выдерживался линейный градиент с 40 до 100% метанола, после чего элюция велась 8 мин в изократическом режиме 100% метанола, затем 5 мин 40% метанола. Масс-спектрометрический анализ проводили, используя электроспрей-интерфейс, настроенный на положительную ионизацию. Напряжение капилляра электроспрея при анализе равнялось 4,5 кВ. Скорость тока азота, применявшегося в качестве распыляющего газа, составляла 4,5 л/мин. Регистрация велась в сканирующем режиме регистрации ионов с соотношением масса/заряд в диапазоне 300–400.

Чувствительность бактерий к токсическим аналогам гиббереллинов изучали путем высева суспензии клеток (0,1 мл, концентрация  $10^{10}$  КОЕ/мл), выращенных до стационарной фазы роста, на минимальную агаризованную среду, содержащую в качестве источника углерода и энергии фруктозу (0,2%), а затем на поверхность среды помещали сухие навески токсических аналогов гиббереллинов. Результаты учитывали после 5-6 сут инкубирования бактерий при 28 °C по наличию зоны задержки роста вокруг навески испытуемого вещества.

Мутагенез бактерий осуществляли путем обработки бактерий N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ) в концентрации 20 мкг/мл в цитратном буфере (pH 5,5) при 28 °C в течение 60 мин. Отмытые от мутагена клетки после сгущения в 10 раз путем центрифугирования высевали на агаризованную среду, содержащую фруктозу (0,2%), а затем на поверхность среды помещали сухие навески токсического аналога гиббереллинов – ССС. После 5–6 сут инкубирования отбирали мутантов, устойчивых к ССС и затем проверяли их на способность к сверхсинтезу гиббереллинов.

Способность бактерий *P. aurantiaca* стимулировать рост растений определяли на 7-11 сут описанным ранее способом [22].

### Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов с использованием растений латука было установлено, что уровень синтеза гиббереллинов бактериями *P. aurantiaca* В-162 соответствует  $13,18 \pm 0,34$  мг/л, а результаты тонкослойной хроматографии позволили установить наличие 7 компонентов со значениями R<sub>f</sub>, равными 0,02; 0,08; 0,25; 0,37; 0,51; 0,815 и 0,85. Проверка биологической активности компонентов показала, что наибольший стимулирующий эффект в отношении растений латука оказывает фракция со значением R<sub>f</sub>, равным 0,02 (рис. 1).

Проведенный далее масс-спектрометрический анализ очищенного препарата этого компонента показал наличие ионов с максимумом поглощения (202 нм), временем удерживания (10,75 мин) и следующим соотношением масса/заряд (m/z): 329 ([M–H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 347 ([M+H]<sup>+</sup>), 364 ([M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 379 ([M+CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>), что соответствует гибберелловой кислоте (ГК<sub>3</sub>) (рис. 2).

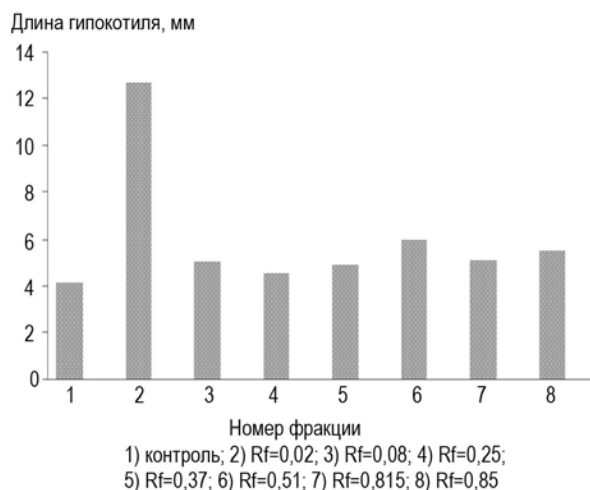


Рисунок 1 - Стимуляция растений латука различными фракциями гиббереллинов, синтезируемых бактериями *P. aurantiaca* В-162

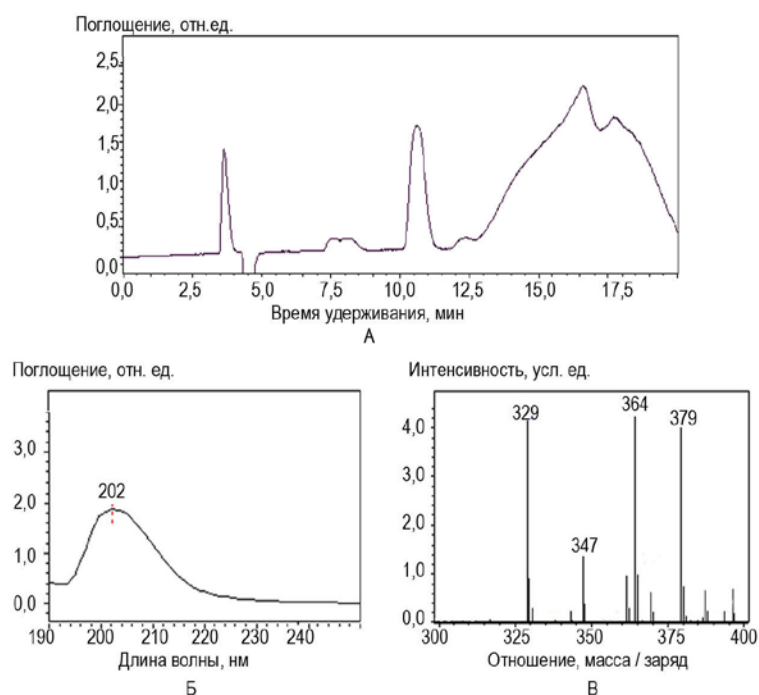


Рисунок 2 - Профиль элюции (А), спектр поглощения (Б) и масс-спектр (В) гибберелловой кислоты, синтезируемого бактериями *P. aurantiaca* В-162

На следующем этапе была исследована чувствительность бактерий *P. aurantiaca* В-162 к токсическим аналогам гиббереллинов: анцимидолу, ССС и кальций-прогексадиону. Установлено, что способностью задерживать рост изучаемых бактерий обладает только ССС, ингибирующий *ent*-копатил дифосфат/ *ent*-каурен синтазу, которая является ферментом общего участка пути синтеза гиббереллинов из мевалоната [12, 15]. Далее в ходе НГ-мутагенеза и последующей селекции на устойчивость к ССС было получено свыше 200 клонов *P. aurantiaca* В-162, среди которых отобрано 5 штаммов, способных к сверхпродукции гиббереллинов (табл. 1).

Как видно из представленных результатов, уровень продукции гиббереллинов аналог-резистентными мутантами достигает 31 мг/л, что 2,3 раза больше, чем таковой у бактерий дикого типа. При этом следует отметить, что продуктивность известных в этом отношении бактериальных штаммов не превышает у ризосферных бактерий *Pseudomonas* 2 мг/л (например, у *P. fluorescens*), у *Rhizobium trifolii* – 3 мг/л, а у грамположительных *B. cereus* и *B. subtilis* – 15-18 мг/л, соответственно [23].

Таблица 1 – Синтез гиббереллинов регуляторными мутантами *P. aurantiaca*

Штамм <i>P. aurantiaca</i>	Продукция гиббереллинов, мг/л	Штамм <i>P. aurantiaca</i>	Продукция гиббереллинов, мг/л
B-162 (контроль)	13,18±0,34	G-18	20,96±1,01
G-8	17,99±0,91	G-50	30,71±0,88
G-17	17,01±0,77	G-52	28,99±0,69

Исследование ростостимулирующей активности аналогрезистентных регуляторных мутантов *P. aurantiaca* с различным уровнем образования гиббереллинов показало, что их действие зависит от продуктивности бактерий. Например, обработка семян латука клетками штамма *P. aurantiaca* B-162 приводит к увеличению длины гипокотилей в 1,88 раза по сравнению с контролем (вода), а клетками штамма G-50 (уровень синтеза гиббереллинов в 2,3 раза выше, чем у B-162) – в 3,37 раза (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние синтезирующих гиббереллины бактерий *P. aurantiaca* на рост растений латука

Штамм <i>P. aurantiaca</i>	Длина гипокотилей, мм	Штамм <i>P. aurantiaca</i>	Длина гипокотилей, мм
B-162	12,64±0,58	G-18	19,67±0,19
G-8	17,20±0,44	G-50	22,64±0,78
G-17	16,10±0,52	G-52	18,99±0,69

Примечание: при проращивании семян в воде длина гипокотилей латука составляла 6,72±0,34 мм

Помимо экспериментов на модельном объекте (латук) были проведены исследования по изучению влияния бактерий *P. aurantiaca* G-50 – продуцента гиббереллинов на рост ряда сельскохозяйственных овощных и технических культур – огурцах, томатах, капусте, редьке масличной и рапсе. Установлено, что обработка семян перечисленных растений клетками этого штамма приводила к увеличению длины проростков и их массы в большей степени, нежели обработка семян клетками исходного штамма, обладающего меньшим уровнем продукции фитогормонов. Интересно, что при обработке семян овощных культур наблюдалось увеличение длины гипокотилей в 1,6-1,9, а масса проростков – в 1,3-1,6 раз (табл. 3), тогда как при обработке семян технических культур данные параметры увеличивались в 1,9-2,1 и 1,7-1,8 раз соответственно (табл. 4). Ранее специфичность действия гиббереллинов в отношении стимуляции роста различных видов растений отмечали и другие авторы [24].

Таблица 3 – Стимуляция роста овощных растений штаммами *P. aurantiaca* B-162 и *P. aurantiaca* G-50

Вариант обработки	Показатель	Сельскохозяйственные культуры		
		огурцы сорт Родничок	томаты сорт Ляна	капуста сорт Русиновка
Контроль (вода)	длина гипокотилей, мм	15,52±1,08	14,95±0,60	11,19±0,09
	масса 10 проростков, мг	44,78±2,05	18,52±0,41	33,61±0,80
<i>P. aurantiaca</i> B-162	длина гипокотилей, мм	18,62±0,93	19,90±0,67	14,42±0,12
	масса 10 проростков, мг	53,36±2,33	20,90±0,58	42,66±1,37
<i>P. aurantiaca</i> G-50	длина гипокотилей, мм	29,45±1,14	25,53±1,12	18,45±1,65
	масса 10 проростков, мг	65,45±3,31	23,15±0,85	53,60±3,33

Таблица 4 – Стимуляция роста технических культур штаммами *P. aurantiaca* В-162 и *P. aurantiaca* G-50

Вариант обработки	Показатель	Сельскохозяйственные культуры	
		рапс	редька масличная
Контроль (вода)	длина гипокотилей, мм	14,47±0,48	16,64±0,67
	масса 10 проростков, мг	92,48±1,23	86,32±1,17
<i>P. aurantiaca</i> В-162	длина гипокотилей, мм	22,89±0,88	28,21±1,12
	масса 10 проростков, мг	122,23±2,35	91,11±1,76
<i>P. aurantiaca</i> G-50	длина гипокотилей, мм	27,49±1,35	34,44±1,72
	масса 10 проростков, мг	166,46±4,47	146,74±3,31

Таким образом, нами осуществлено выделение и идентификация гиббереллинов, синтезируемых бактериями *P. aurantiaca* В-162; впервые предложен метод отбора мутантов, способных к сверхсинтезу гиббереллинов путем использования в качестве селектирующего фактора токсических аналогов фитогормона, в частности, (2-хлорэтил)триметил аммоний хлорида. На основе бактерий *P. aurantiaca* получены мутанты, синтезирующие до 31 мг/л гиббереллинов, что в 2,3 раза выше, чем продуктивность исходного штамма. Показано, что степень стимулирующего рост растений действия зависит от уровня синтеза гиббереллинов мутантными штаммами. Следует отметить, что бактерии *P. aurantiaca* обладают рядом других полезных свойств, в частности, являются активными антагонистами по отношению к возбудителям болезней сельскохозяйственных культур, что, как указывалось выше, обусловлено синтезом антибиотиков феназинового ряда и пирролнитрина.

Авторы благодарят ассистента кафедры биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета Елену Олеговну Корик за проведение HPLC анализа.

#### Список литературы

1. Смирнов В.В., Киприянова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*.– Киев: Наук. думка, 1990.– 264 с.
2. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Experiment. Botany. 2001. Vol. 52, № 1. P. 487-511.
3. Feklistova I. N., Maksimova N. P. Obtaining *Pseudomonas aurantiaca* strains capable of overproduction of phenazine antibiotics // Microbiology. 2008. Vol. 77., №2. P. 176-180.
4. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. Синтез пирролнитрина бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 // Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем: Труды Белорусского государственного университета. Т. 3., ч. 1 / под ред. В.М. Юрина.– Минск: 2008.– С. 148–155.
5. Феклистова И.Н., Веремеенко Е.Г. Стимуляция роста растений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 // Актуальные проблемы изучения фито- и микобиоты: Сб. статей / Под ред. В.Д. Поликсеновой.– Минск: 2004.– С. 203–205.
6. Burr T.J., Schoth M.N., Suslow T. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* // Phytopatology. 1978. Vol. 68. № 9. P. 1377-1383.

7. Suslow T.W., Schroth M.N. Rhizobacteria of sugar beet: effects of seed application and root colonization on yield // *Phytopatology*. 1982. Vol. 72. № 2. P. 199-206.
8. Inoculation of plant growth, yields and physiological properties of tubers in potato and sugar-beet regions J. Vraný, M. Rasochova, A. Fiker e.a. // *Folia Microbiol.* 1990. Vol. 35. № 2. P. 326-335.
9. Pattern C.L., Glick B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. Vol. 68. № 8. P. 3795-3801.
10. de Bellis P., Ercolani G.L. Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootless // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. № 4. P. 1945-1948.
11. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига, Зинатне, 1988. 151 с.
12. Wada K. New gibberellin biosynthesis inhibitors, 1-n-decyl- and 1-geranylimidazole: inhibitors of (-)-kaurene 19-oxidation // *Agric. Biol. Chem.* 1978. Vol. 42. P. 2411-2413.
13. The plant growth retardant CCC as inhibitor of gibberellin biosynthesis in *Fusarium moniliforme* H. Ninnemann, J. Zeevaart, H. Kende e.a. // *Planta*. 1964. Vol. 61. P. 229-235.
14. Crozier A., Reid D., Reeve D. Effects of AMO-1618 on growth, morphology and gibberellin content of *Phaseolus cocineus* seedlings // *J. Exp. Bot.* 1973. Vol. 24. P. 923-931.
15. Lee I.I., Foster K.R., Morgan P.W. Effects of gibberellin biosynthesis inhibitors on native gibberellin content, growth and floral initiation in *Sorghum bicolor* // *J. Plant Growth Regul.* 1998. Vol. 17. P. 185-195.
16. Inhibition of abscisic acid biosynthesis in *Cercospora rosicola* by inhibitors of gibberellin biosynthesis and plant growth retardants S.M. Norman, S.M. Poling, V.P. Maier e.a. // *Plant Physiol.* 1983. Vol. 71. P. 15-18.
17. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.– М: Мир, 1976.– 370 с.
18. Tien T. M., Gaskins M. H., Hubbell D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979. Vol. 37. No. 5. P. 1016-1024.
19. MacMillan J., Suter P.J. Thin layer chromatography of the gibberellins // *Nature*. 1963. Vol. 197. P. 790.
20. Candau R., Avalos J., Cerdá-Olmedo E. Regulation of Gibberellin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* // *Plant Physiology*. 1992. Vol. 100. P. 1184-1188
21. Evensen K.B., Blevins D.G. Differences in endogenous levels of gibberellin-like substances in nodules of *Phaseolus lunatus* L. plants inoculated with two *Rhizobium* strains // *Plant Physiol.* 1981. Vol. 68. P. 195-198.
22. Repeated introduction of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r without intensified effects on the indigenous microflora of field-grown wheat. M. Viebahn, D.C.M. Glandorf, T. Ouwens e.a. // *Appl. Environ. Microbiol.*–2003.– Vol. 69, № 6.– P. 3110–3118.
23. Katznelson H., Cole S.E. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes // *Can. J. Microbiol.* 1965. Vol. 11. P. 733-741.
24. The biological activities of 26 gibberellins in nine plant bioassays. A. Crozier, C.C. Kuo, R.C. Durley e.a. // *Can. J. Botany*. 1970. Vol. 48. P. 867-877.