



УДК 577.175.1+579.841.3+632.35

Н. О. Леонова, Л. А. Данкевич, І. В. Драгвоз,
академік НААН України В. П. Патика,
член-кореспондент НАН України Г. О. Іутинська

Синтез позаклітинних фітогормонів-стимуляторів бульбочковими та фітопатогенними бактеріями сої

Досліджено здатність до синтезу позаклітинних ауксинів і цитокінінів ризобіями сої та патогенними для цієї культури бактеріями. Показано різну фізіологічну спрямованість дії фітогормонів-стимуляторів при формуванні взаємовідношень цих мікроорганізмів з рослиною-хазяїном.

Відомо, що синтез основних метаболітів, регуляція їх транспорту та, відповідно, спрямування морфогенетичних процесів у рослин відбувається за участю фітогормонів [1]. Серед асоційованих з рослиною мікроорганізмів здатність утворювати фітогормони-стимулятори властива як симбіотичним, так і патогенним бактеріям. Зокрема, синтез ауксинів бульбочковими бактеріями покращує колонізацію кореневої системи, стимулює нодуляцію, що у подальшому позитивно впливає на розвиток ефективної симбіотичної системи та підвищує урожайність [2, 3]. Натомість гіперсинтез ауксинів фітопатогенними мікроорганізмами призводить до порушення гормонального статусу рослини, виникнення та розвитку ряду захворювань і розглядається як один із ключових факторів їх патогенності [4, 5].

На думку багатьох дослідників, серед усіх класів фітогормонів роль сигнальних молекул, що регулюють взаємодію мікро- та макроорганізмів, зокрема у процесах симбіозу та патогенезу, відіграють саме ауксини та цитокініни [3–6].

Метою дослідження було порівняння здатності до синтезу ауксинів та цитокінінів різних за ефективністю мікросимбіонтів сої роду *Bradyrhizobium* і патогенних для даної культури бактерій родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pantoea* монофагової та поліфагової природи.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктами досліджень були бульбочкові та фітопатогенні бактерії сої родів: *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* та *Pantoea*. Досліджено високоефективні штами ризобій сої *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6023, *B. japonicum* УКМ В-6036 та неефективний штам *B. japonicum* 604к; фітопатогенні бактерії, що є класичними поліфагами: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, що уражує понад 50 видів рослин, серед яких і бобові культури, *P. syringae* pv. *tabaci* 225, що викликає

© Н. О. Леонова, Л. А. Данкевич, І. В. Драгвоз, В. П. Патика, Г. О. Іутинська, 2013

дикий опік сої та захворювання різних видів тютюну, *Pantoea agglomerans* 8490, що є причиною виникнення бактеріальної смугастості стебла сої та уражує інші види культурних рослин [7]; фітопатогенні бактерії монофагової природи: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8609 — збудник пустульного бактеріозу сої та *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 — збудник кутастої плямистості сої.

Культивування бульбочкових бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл на качалці (220 об/хв) при 26–28 °С та рН 6,6–7,0 протягом 72–96 год у рідкому поживному манітно-дріжджовому середовищі. Штами *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *P. syringae* pv. *tabaci* 225, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та *P. agglomerans* 8490 культивували за тих самих умов протягом 24 год у рідкому мінеральному середовищі Омелянського з додаванням 1% триптофану, збудника пустульного бактеріозу (*X. axonopodis* pv. *glycines* 8609) — у рідкому поживному синтетичному середовищі Ліча. Для відділення біомаси від екзополімерів культуральні рідини центрифугували протягом 20 хв при 15 000 г та кімнатній температурі. Клітини бактерій відмивали від залишків екзополімерів фізіологічним розчином тричі, кожний раз центрифугуючи 20 хв при 5000 г та кімнатній температурі. Осад клітин висушували до постійної маси.

Позаклітинні фітогормони виділяли із супернатанту культуральних рідин бактерій методом перерозподілу у двох не змішуваних між собою фазах [8]. Подальше їх концентрування та очищення проводили методом препаративно-накопичувальної тонкошарової хроматографії. Визначення якісного та кількісного складу фітогормонів-стимуляторів здійснювали методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [9]. Кількість позаклітинних фітогормонів-стимуляторів розраховували в мкг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Результати та їх обговорення. Всі досліджені симбіотичні штами ризобій сої здатні синтезувати індольні сполуки. Зокрема, здатність до синтезу ауксинів виявилась для ризобій штамовою ознакою, що не завжди корелює з їх симбіотичною активністю (табл. 1). Неактивний штам *V. japonicum* 604к, що утворює велику кількість бульбочок з практично відсутньою нітрогеназною активністю, здатний синтезувати ауксини в значних кількостях. Штам синтезує різні індольні сполуки (індол-3-карбоксилу кислоту, індол-3-карбінол та індол-3-оцтової кислоти гідрозид), але не синтезує фізіологічно активного для рослин ауксину — індол-3-оцтової кислоти (ІОК). Сумарний рівень синтезу ауксинів є практично рівноцінним аналогічному показнику у високоефективного штаму *V. japonicum* УКМ В-6036, що також не синтезує ІОК. Інший високоактивний штам *V. japonicum* УКМ В-6023, хоча і має незначний рівень загального синтезу ауксинів, але на відміну від решти мікросимбіонтів сої синтезує ІОК.

Таблиця 1. Позаклітинні ауксини *V. japonicum*

Ауксини	Кількість ауксинів, мкг/г АСБ		
	<i>V. japonicum</i> 604к	<i>V. japonicum</i> УКМ В-6023	<i>V. japonicum</i> УКМ В-6036
ІОК	Слідові кількості	5,2	Слідові кількості
Індол-3-карбоксилу кислота	216,1	Слідові кількості	772,8
Індол-3-карбінол	442,3	39,1	369,7
Індол-3-оцтової кислоти гідрозид	408,9	9,8	598,5
Індол-3-карбоксалдегід	Слідові кількості	Слідові кількості	Слідові кількості
Загальна кількість ауксинів	1067,4	54,1	1222,2

Згідно з даними літератури, синтез ауксинів ризобактеріями пов'язаний переважно з початковими етапами інфікування рослини-хазяїна. Бульбочкові бактерії розглядають як “слабкі” патогени, адже первинні стадії формування симбіотичних взаємозв'язків є інфекційним процесом [10, 11]. Досліджувані штами *B. japonicum* мають високу вірулентність та нодуляційну активність, тому значний рівень синтезу ауксинів є цілком закономірним. В подальшому, при формуванні нодуляційного апарату, ризобіальні ауксини беруть участь в регуляції рослиноспецифічних метаболічних процесів: клітинного поділу, диференціації і формуванні судинного пучка [11]. Ці етапи морфогенезу є необхідними для ефективного розвитку кореневої системи і формування бульбочок. Але для активного функціонування симбіозу вирішальне значення має співвідношення гормонів стимулювальної дії, зокрема ауксинів та цитокінінів, що є визначальним сигналом для генетично детермінованих процесів росту і розвитку у рослин.

Аналогічно мікросимбіонтам сої фітопатогенні бактерії, що уражують цю культуру, також здатні до синтезу широкого спектра ауксинів. На відміну від ризобій, у фітопатогенних бактерій спостерігається чітка пряма кореляція між їх здатністю уражувати широкий чи, навпаки, вузький спектр рослин та загальним рівнем синтезу ауксинів. Зокрема, штами, що є класичними поліфагами, тобто крім сої уражують інші культурні рослини — *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. agglomerans* 8490 і *P. syringae* pv. *tabaci* 225, синтезують у 2–13 разів більше індолних сполук порівняно з монофагами, що викликають виключно захворювання сої — *P. savastanoe* pv. *glycinea* 8571 та *X. axonopodis* pv. *glycines* 8609 (табл. 2). Слід звернути увагу на те, що *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, що уражує найбільшу кількість видів рослин, синтезує найширший спектр та найбільшу кількість ауксинів, перш за все комплексу ІОК та індол-3-карбоксілової кислоти. За даними літератури, у зазначеного фітопатогену синтез ІОК пов'язаний із синтезом одного з ключових його токсинів — сирингоміцину. Показано, що мутантні за синтезом ІОК штами *P. syringae* pv. *syringae* продукують значно менші кількості сирингоміцину порівняно зі штамами, здатними до синтезу цього ауксину [12]. Рядом дослідників встановлено, що даний токсин здатний змінювати трансмембранний транспорт K^+ , H^+ , Ca^{2+} та Fe^{2+} у клітинах, що призводить до загибелі рослини. Крім того, зміна K^+/H^+ трансмембранного обміну викликає порушення процесу поглинання клітинами рослин сахарози і підвищення в такий спосіб її концентрації в міжклітинному просторі, внаслідок чого чисельність бактерій на початкових етапах інфек-

Таблиця 2. Позаклітинні ауксини фітопатогенних для сої бактерій

Ауксини	Кількість ауксинів, мкг/г АСБ				
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	<i>Pantoea agglomerans</i> 8490	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 225	<i>Pseudomonas savastanoe</i> pv. <i>glycinea</i> 8571	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 8609
ІОК + індол-3-карбоксілова кислота	826,13	688,00	586,00	216,93	147,38
Індол-3-карбінол	106,18	Слідові кількості	Слідові кількості	Слідові кількості	Слідові кількості
Індол-3-оцтової кислоти гідразид	1055,60	Слідові кількості	Слідові кількості	232,04	Слідові кількості
Індол-3-карбоксіальдегід	Слідові кількості	636,00	362,80	6,12	Слідові кількості
Загальна кількість ауксинів	1987,91	1327,00	948,80	455,09	147,38

ційного процесу значно зростає [12, 13]. Таким чином, рівень синтезу ІОК опосередковано впливає на перебіг патогенного процесу, що спричиняє в рослинах *P. syringae* pv. *syringae*.

Решта досліджених поліфагів продукують дещо вужчий спектр індолних сполук. Штами *P. agglomerans* 8490 і *P. syringae* pv. *tabaci* 225 у найбільших кількостях синтезують комплекс ІОК та індол-3-карбоксилової кислоти (див. табл. 2). Достатньо високий рівень синтезу *P. agglomerans* 8490 саме цих ауксинів, ймовірно, може бути пов'язаний з функціонуванням поряд з основним шляхом біосинтезу ІОК (через індол-3-ацетамід) паралельного шляху (перетворення індоліл-3-піровиноградної кислоти або індоліл-3-оцтового альдегіду) [4, 6]. Крім того, цей вид може колонізувати усі компоненти філосфери, тому взаємодія з рослиною, у якій важливу роль відіграє ІОК, є особливою характеристикою його біології [3, 7].

Монофаги, що досліджувались нами, істотно відрізняються за здатністю до синтезу ауксинів. Так, *P. savastanoe* pv. *glycinea* 8571 синтезує комплекс ІОК та індол-3-карбоксилової кислот, індол-3-оцтової кислоти гідразид та індол-3-карбоксальдегід. Збудник пустульного бактеріозу — *X. axonopodis* pv. *glycines* 8609 синтезує тільки комплекс ІОК та індол-3-карбоксилової кислоти.

Слід також зазначити, що загальна кількість позаклітинних ауксинів, синтезованих високоагресивними штамми фітопатогенних бактерій, дещо вища порівняно з аналогічним показником у високоактивних штамів бульбочкових бактерій сої. На думку дослідників, ауксини як бульбочкових, так і фітопатогенних бактерій беруть активну участь на початкових етапах інфікування рослин, після чого характер взаємовідношень з рослиною цих груп мікроорганізмів суттєво відрізняється: симбіотичні діазотрофи утворюють азотфіксувальний нодуляційний апарат, а фітопатогенні бактерії далі розвивають інфекційний процес, стимулюючи ріст рослинних клітин шляхом розтягнення і, відповідно, полегшують проникнення патогену в клітини рослини-хазяїна [1].

Характер синтезу цитокінінів ризобіями та фітопатогенними бактеріями сої відрізнявся від встановленого для ауксинів. Так, усі досліджені штамми мікросимбіонтів сої здатні синтезувати спектр цитокінінів, що відрізнявся як за якісним, так і кількісним складом.

Раніше нами було встановлено, що висока біологічна активність симбіотичних бактерій корелює з їх здатністю до синтезу фітогормонів цитокінінового типу [14]. На підставі цього було запропоновано застосовувати як біохімічну характеристику симбіотичної ефективності *V. japonicum* їх здатність синтезувати позаклітинні фітогормони цитокінінової природи. Також було висловлено припущення щодо гормонзалежного механізму адаптації цих бактерій до умов довкілля, що забезпечує формування ефективних взаємовідношень між ризобіями і рослинами [15].

Одержані результати підтвердили відмічену нами у попередній роботі [15] закономірність щодо прямої кореляції між симбіотичною ефективністю штамів ризобій та рівнем синтезу цитокінінів. Так, високоефективні штамми мікросимбіонтів сої — *V. japonicum* В-6023 та *V. japonicum* В-6036 продукували у значних кількостях цитокініни зеатин та зеатинрибозид (рис. 1). Обидва високоефективні штамми бульбочкових бактерій здатні до синтезу всього спектра цитокінінів. Неєфективний штам *V. japonicum* 604к синтезував дещо вужчий спектр цитокінінів (зеатин, зеатинрибозид, ізопентеніладенозин) у значно менших, порівняно з високоефективними штамми, кількостях. На думку багатьох дослідників, саме цитокініни відіграють важливу роль у формуванні бульбочок, оскільки саме вони стимулюють процеси проліферації, біосинтезу білка і РНК клітин рослинної тканини [2, 4, 5, 11].

Слід відзначити, що в найбільших кількостях усі досліджені штамми бульбочкових бактерій здатні синтезувати транспортну форму цитокінінів — рибозильований зеатин, що ві-

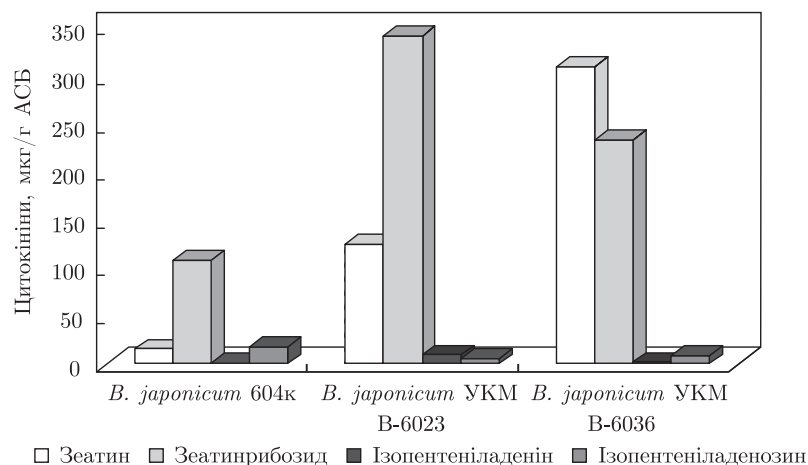


Рис. 1. Синтез позаклітинних цитокінінів ризобіями сої різної симбіотичної активності

діграє важливу роль у формуванні адаптивних взаємовідношень цих мікроорганізмів з рослиною-хазяїном [2, 4, 11].

Нами у досліджених фітопатогенних бактерій монофагової та поліфагової природи — збудників захворювань сої, виявлено дещо нижчий порівняно з ризобіями рівень і вузький спектр синтезу цитокінінів (табл. 3). Зокрема, усі досліджені штами роду *Pseudomonas* не синтезують фізіологічно активної форми цитокінінів — зеатину, що є важливим у регуляції клітинного метаболізму у рослин. Серед поліфагів найбільший спектр синтезованих позаклітинних цитокінінів та найвища їх кількість характерна для штаму *P. agglomerans* 8490. Цей штам синтезує найбільшу кількість транспортної форми цитокінінів — зеатинрибозид. На наш погляд, такий високий рівень синтезу зеатинрибозиду *P. agglomerans* 8490 пов'язаний з особливостями біології виду. Відомо, що цей вид як у епіфітному, так і в ендоефітному стані є постійною складовою філосфери та ризосфери рослин. Залежно від умов навколишнього середовища мікроорганізм може перебувати в неагресивній або патогенній для рослин формі [7]. Крім того, як і у пухлиноіндукуючих видів, у представників *P. agglomerans* гени, відповідальні за синтез цитокінінів, локалізовані в плазмідах, а відтак і кількість їх

Таблиця 3. Позаклітинні цитокініни фітопатогенних для сої бактерій

Цитокініни	Кількість цитокінінів, мкг/г АСБ				
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	<i>Pantoea agglomerans</i> 8490	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 225	<i>Pseudomonas savastanoe</i> pv. <i>glycinea</i> 8571	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 8609
Зеатин	Слідіві кількості	31,51	Слідіві кількості	Слідіві кількості	15,60
Зеатинрибозид	13,70	1695,00	80,29	16,60	52,30
Ізопентеніладенін	62,71	Слідіві кількості	113,71	58,70	3,27
Ізопентеніладенозин	Слідіві кількості	187,00	Слідіві кількості	Слідіві кількості	15,50
Загальна кількість цитокінінів	76,41	1913,51	194,00	75,30	102,27

копій є значно більшою порівняно з видами, що мають геномне розташування аналогічних генів [3, 4].

Деякими дослідниками показано, що позаклітинні мікробні цитокиніни можуть пригнічувати репродукцію окремих патогенів, таким чином регулюючи процес колонізації рослин певними мікроорганізмами [4]. Слід також зазначити, що мікроорганізми здатні використовувати цитокиніни як додаткове джерело азоту (наприклад, для синтезу нуклеїнових кислот), що може стимулювати їх ріст і, таким чином, прискорювати розвиток інфекційного процесу [4, 5]. Останнє, напевно, значною мірою і пояснює наявність у решти не пухлиноіндукуючих штамів поліфагової та монофагової природи “базового” рівня синтезу цитокинінів, що при цьому не впливають на метаболізм рослинних клітин. Зокрема, збудник пустульного бактеріозу — *X. axonopodis* pv. *glycines* 8609 здатний синтезувати в невеликих кількостях усі чотири цитокиніна, в тому числі і зеатинрибозид (див. табл. 3). Натомість, ще один монофаг *P. savastanoe* pv. *glycinea* 8571 синтезує тільки ізопентеніладенін та рибозильовану форму зеатину.

Таким чином, синтез ауксинів і цитокинінів як бульбочковими, так і фітопатогенними бактеріями сої безпосередньо пов'язаний з етапами їхньої взаємодії з рослиною. Зокрема, у високоефективних мікросимбіонтів сої, на відміну від фітопатогенів, здатність до синтезу більш широкого спектра та великої кількості цитокинінів пов'язана з утворенням ефективного симбіозу з рослиною. Натомість, бактерії — збудники захворювань сої, здатні синтезувати більшу кількість та ширший спектр ауксинів, що можна розглядати як один із факторів їх патогенності. Тобто різні класи фітогормонів-стимуляторів у ризобій та фітопатогенів відіграють важливу роль при взаємодії цих мікроорганізмів з рослинами-хазяїнами.

1. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* / Ed. P. J. Davies. – Dordrecht: Kluwer, 2004. – 750 p.
2. Boiero L., Perrig D., Masciarelli O. et al. Phytohormone production by the strains of *B. japonicum* and possible physiological and technological implications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – **74**. – P. 874–880.
3. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2007. – **31**. – P. 425–448.
4. Цавкелова Е. А., Климova С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 2006. – **42**, № 2. – С. 133–143.
5. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface.* – 2nd ed. / Ed. R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. – 472 p.
6. Patten Ch. L., Glik B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // *Can. J. Microbiol.* – 1996. – **42**, No 3. – P. 207–220.
7. Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Яковлева Л. М., Мороз С. М., Литвинчук О. О., Житкевич Н. В., Ходос С. Ф., Буценко Л. М., Данкевич Л. А., Гриник І. В., Патики В. П. Біологія. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В. П. Патики. – Київ: ТОВ “НВП “Інтерсервіс”, 2011. – 444 с.
8. *Методические рекомендации по определению фитогормонов.* – Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. – 78 с.
9. Савинский С. В., Кофман И. Ш., Кофанов В. И., Стасевская И. Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // *Фициология и биохимия культ. растений.* – 1987. – **19**, № 2. – С. 210–215.
10. Suslow T. V., Schroth M. N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth // *Phytopathology.* – 1982. – **72**, No 1. – P. 111–115.
11. Спайнк Г., Кондороши А., Хукас П. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. И. А. Тихоновича, Н. А. Проворова. – Санкт-Петербург: ИПК “Бионт”, 2002. – 568 с.

12. *Mazzola M., White F. F.* A mutation in indole-3-acetic acid pathway *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects growth in *Phaseolus vulgaris* and syringomycin production // *J. Bacteriology*. – 1994. – **176**, No 5. – P. 1374–1382.
13. *Berner C. L., Alarcon-Chaidez F., Gross D. C.* *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1999. – **93**, No 2. – P. 266–292.
14. Патент України на винахід UA 95878 МПК A01N 63/02 C05F 11/08. Спосіб визначення біологічної активності штамів бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium* / І. В. Драговоз, Н. О. Леонова, Г. О. Іутинська, В. К. Яворська. – Опубл. 12.09.2011, Бюл. № 17.
15. Драговоз І. В., Леонова Н. О., Біляєвська Л. О., Яворська В. К., Іутинська Г. О. Продукування фітогормонів деякими вільноіснуючими та симбіотичними ґрунтовими мікроорганізмами // Доп. НАН України. – 2010. – № 12. – С. 154–159.

*Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 20.06.2012

Н. О. Леонова, Л. А. Данкевич, І. В. Драговоз,
академик НААН України **В. Ф. Патыка,**
член-корреспондент НАН України **Г. А. Иутинская**

Синтез внеклеточных фитогормонов-стимуляторов клубеньковыми и фитопатогенными бактериями сои

Исследована способность к синтезу внеклеточных ауксинов и цитокининов ризобиями сои и патогенными для этой культуры бактериями. Показана различная физиологическая направленность действия фитогормонов-стимуляторов при формировании взаимоотношений этих микроорганизмов с растением-хозяином.

N. O. Leonova, L. A. Dankevych, I. V. Dragovoz,
Academician of the NAAS of Ukraine **V. F. Patyka,**
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **G. O. Iutynska**

Synthesis of extracellular phytohormones-stimulators by nodule bacteria and bacteria phytopathogenic for soybean

The ability to synthesize extracellular phytohormones such as auxins and cytokinins by soybean rhizobia and bacteria pathogenic for soybean has been researched. The different physiological directions of phytohormones-stimulators at the formation of relationships between these microorganisms and host plant are demonstrated.