

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

СИНТЕЗ ПАТОГЕННЫМИ ДЛЯ БОБОВЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS* ГОРМОНОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Изучена способность патогенных для бобовых культур патогенов рода *Pseudomonas* продуцировать этилен и абсцизовую кислоту *in vitro*. Выявлена прямая зависимость между уровнем продукции этилена возбудителем бактериального ожога гороха — *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* и уровнем его агрессивности на растениях. Показано, что количество абсцизовой кислоты синтезированной патогенными для бобовых культур бактериями рода *Pseudomonas*, как правило, коррелирует с их агрессивностью на растениях.

Ключевые слова: этилен, абсцизовая кислота, бактерии рода *Pseudomonas*, бобовые культуры.

Идентификация и своевременная диагностика возбудителей заболеваний растений – одни из ключевых факторов в борьбе с их распространением. Известно, что фитопатогенные бактерии способны существенно снижать урожайность сельскохозяйственных растений. Бобовые культуры не составляют исключения. Ситуация осложняется тем, что идентификация на уровне патовара, а в отдельных случаях и вида, например, представителей рода *Pseudomonas*, которые поражают бобовые с помощью общепринятых микробиологических методов, является практически невозможной [1]. Именно поэтому, в последнее время все большую популярность приобретает диагностика некоторых патогенов на уровне патовара на основе детекции, специфических факторов патогенности (фитогормонов, ферментов, токсинов и т.д.) [9]. Этилен – один из ключевых фитогормонов, который оказывает сильное влияние на рост и развитие растений, в частности: тормозит рост, растяжение клеток, нарушает геотропизм, способствует опаданию листьев, ускоряет процессы созревания плодов и старения. Способностью синтезировать данный фитогормон обладают не только растения, но и микроорганизмы, ассоциированные с растениями. Например, продуцировать этилен, как фактор патогенности, могут отдельные фитопатогенные бактерии, в частности: *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Pseudomonas syringae* [8]. Некоторыми исследователями показано, что различные патогенные для растений представители рода *Pseudomonas* отличаются по способности синтезировать этилен [11, 12].

Абсцизовая кислота (АБК) – также один из ключевых гормонов, оказывающих ингибирующее влияние на рост и развитие растений. В частности, она способствует опаданию листьев, закрытию устьиц и развитию процесса старения, поддержанию в состоянии покоя почек и семян, ингибирует синтез ДНК, РНК и некоторых ферментов. По мнению многих исследователей, способность фитопатогенов синтезировать АБК, которая, в свою очередь, может стимулировать рост этих микроорганизмов, рассматривается как фактор, определяющий их патогенность при инфицировании растений [8].

Именно поэтому, целью нашей работы было исследование способности продуцировать этилен и абсцизовую кислоту патогенными для бобовых растений патоварами рода *Pseudomonas in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали 36 штаммов патогенных для бобовых культур бактерий рода *Pseudomonas* любезно предоставленных из коллекции отдела фитопатогенных бактерий ИМВ НАНУ и 12 штаммов изолированных нами из пораженных растений люпина. Типовой штамм *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T был включен в исследования для сравнения, поскольку к данному виду отнесены pv. *glycinea* и pv. *phaseolicola*, поражающие бобовые растения. Для определения этилена штаммы культивировали в течение суток на агаризованной минеральной среде при 28 °С в герметически закрытых флаконах. Состав воздуха над столбиком агаризованной среды анализировали с помощью газового хроматографа Chrom-5 [5]. Вирулентные свойства штаммов предварительно исследовали на фасоли

сорта Мавка, горохе сорта Харьковский, сое сорта Киевская 98, 9 районированных сортах белого и желтого люпина, кормовых бобах сорта Хоросткивские, сирени и жасмине. Искусственное заражение растений проводили общепринятыми методами. Учет вирулентности штаммов осуществляли по разработанной нами ранее 10 бальной шкале [1]. Абсцизовую кислоту определяли в культуральных жидкостях исследуемых штаммов. Абсцизовую кислоту получали за счет перераспределения в двух не смешиваемых между собой фазах. Следующее концентрирование и очистку экстрактов проводили методом препаративно-накопительной тонкослойной хроматографии. Определение качественного и количественного содержания АБК осуществляли методом спектроденситометрической тонкослойной хроматографии [7].

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты подтверждают способность подавляющего большинства протестированных штаммов продуцировать этилен *in vitro* (табл. 1). В частности, значительные количества данного фитогормона синтезируют следующие патогенные для растений представители рода *Pseudomonas*: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* — возбудитель угловатой пятнистости сои, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* — возбудитель бактериального ожога гороха и полифаг — *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, что не противоречит данным литературы (табл. 1, табл. 2).

Таблица 1

Синтез этилена патогенными для бобовых культур патоварами рода *Pseudomonas in vitro*

| Вид, патовар | Количество протестированных штаммов | Количество этилена, нМ·час ⁻¹ ·г ⁻¹ |
|--|-------------------------------------|---|
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> | 5 | 2,4–78,4 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> | 6 | 0,6–2,4 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> | 6 | 1,5–115,8 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> | 3 | 0,5–31,9 |
| <i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») | 10 | 0,3–9,0 |
| <i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> | 2 | 0,7–6,5 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 4 | 2,3–15,4 |
| « <i>Pseudomonas xanthochlora</i> » | 11 | 0,2–5,2 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 9174 [†] | 1 | 7,5 |

Таблица 2

Сравнительный анализ синтеза этилена штаммами *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. savastanoi* pv. *glycinea* и уровня их агрессивности на растениях-хозяевах

| Вид, штамм | Количество этилена, нМ·час ⁻¹ ·г ⁻¹ | Средний уровень агрессивности штаммов на растениях-хозяевах, баллы |
|--|---|--|
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> 9177 [†] | 99,7 | 9,0±0,40 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> B-1018 | 115,8 | 8,3±0,24 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> 7156 | 31,0 | 8,0±0,5 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> 7152 | 26,3 | 7,6±0,23 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> 7150 | 1,5 | 5,0±0,33 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> 7151 | 0 | 0 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B-1027 [†] | 31,9 | 8,3±0,25 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8414 | 0,45 | 7,6±0,23 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8565 | 0,54 | 6,3±0,23 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 9074 | 29,9 | 8,2±0,29 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 9072 | 7,3 | 7,5±0,52 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 9171 | 24,6 | 7,0±0,78 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> B-1019 | 2,4 | 6,22±0,74 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571 | 78,4 | 6,0±0,59 |

Среди них наиболее высокий уровень продукции этилена наблюдается именно у возбудителя бактериального ожога гороха — *P. syringae* pv. *pisi*. Кроме того, для данного возбудителя уровень синтеза этилена штаммами непосредственно коррелирует с уровнем их агрессив-

ности на горохе. Исключение составил лишь коллекционный штамм *P. syringae* pv. *pisi* 7151, потерявший свою агрессивность и способность образовывать этилен (табл. 2).

Следует отметить, что ни для возбудителя угловатой пятнистости сои — *P. savastanoi* pv. *glycinea* ни для полифага — *P. syringae* pv. *syringae* прямой зависимости между уровнем продукции этилена и уровнем их агрессивности на растениях нами не отмечено (табл. 2). Значит, для данных фитопатогенов продукция этилена является штаммовой особенностью. Полученные нами результаты, конечно, требуют подтверждения на генетическом уровне, путем детектирования генов, ответственных за синтез этилена. Поскольку, согласно данным литературы, гены ответственны за образование этилена у микроорганизмов, подобны и локализованы в плаزمидях в так называемых «островках патогенности», и, конечно, существует их горизонтальный перенос [11, 12].

На наш взгляд, высокий уровень продукции этого фитогормона *P. syringae* pv. *pisi* объясняется тем, что согласно литературным данным, возбудитель бактериального ожога гороха не синтезирует других, так называемых, «специфических факторов патогенности», в частности токсинов [9]. Наверное, именно этилен играет одну из ключевых ролей в уровне его агрессивности на растениях. В то время как возбудитель угловатой пятнистости сои — *P. savastanoi* pv. *glycinea* способен продуцировать различные типы специфического токсина корантина так и полифаг — *P. syringae* pv. *syringae* синтезирует целый спектр родственных токсинов липодепептидной природы (сирингомицины, сирингопептиды т.п.) [9].

Итак, нами подтверждена способность подавляющего большинства протестированных патогенных для бобовых растений представителей рода *Pseudomonas* синтезировать этилен *in vitro*. Показано, что уровень синтеза этилена штаммами *P. syringae* pv. *pisi* непосредственно коррелирует с уровнем их агрессивности, что может быть перспективным при экспресс-идентификации данного возбудителя.

Изучение способности патогенных для бобовых патогенов рода *Pseudomonas* синтезировать абсцизовую кислоту *in vitro* выявило четкую корреляцию между их свойством поражать широкий или, наоборот, узкий спектр растений и общим уровнем синтеза АБК. Так, штамм *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^Т, который является классическим полифагом, синтезирует в 2-3 раза больше данного индольного соединения по сравнению с остальными штаммами - монофагами (табл. 3) [3, 10].

Таблица 3

Синтез экзогенной абсцизовой кислоты штаммами рода *Pseudomonas*, патогенными для бобовых *in vitro*

| Штаммы | Количество абсцизовой кислоты, мкг/г абсолютно сухой биомассы (АСБ) |
|--|---|
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 9174 ^Т | 60,42 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> В-1027 ^Т | 624,20 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> В-1123 | 240,00 |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571 | 77,78 |
| <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> 9177 ^Т | 156,87 |

Кроме того, для возбудителя бурой бактериальной пятнистости люпина *P. syringae* (“*P. lupini*”) выявлена зависимость между уровнем продукции абсцизовой кислоты и степенью агрессивности штамма на районированных сортах люпина. В частности штаммы, принадлежащие к группе высокоагрессивных, синтезируют большие количества абсцизовой кислоты по сравнению со среднеагрессивными. Низкоагрессивный штамм *P. syringae* (“*P. lupini*”) 22 продуцирует наименьшее количество абсцизовой кислоты среди всех исследованных штаммов (табл. 4), что согласуется с литературными данными [2, 6].

Итак, уровень синтеза гормонов ингибирующих рост и развитие растений исследованными штаммами может коррелировать с их патогенными свойствами. В частности, нами показана прямая зависимость между уровнем синтеза этилена штаммами *P. syringae* pv. *pisi* и степенью его агрессивности на горохе. Но, для остальных исследованных нами патогенов рода *Pseudomonas*, поражающих бобовые культуры, количество синтезированного этилена не

связано с уровнем их агрессивности на растении-хозяине. На примере патогенных для бобовых культур бактерий рода *Pseudomonas* нами также показана связь между моно или полифаговой природой патогенна, степенью агрессивности его на растениях-хозяевах и уровнем продукции экзогенной абсцизовой кислоты.

Таблица 4

Сравнительная характеристика продукции экзогенной абсцизовой кислоты возбудителем бурой бактериальной пятнистости люпина – *P. syringae* (“*P. lupini*”) и уровня его агрессивности на люпине

| Штаммы | Количество абсцизовой кислоты, мкг/г абсолютно сухой биомассы (АСБ) | Средний уровень агрессивности штаммов на люпине, баллы |
|--|---|--|
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 8531 | 289,64 | 6,6±0,23 |
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 8532 | 412,79 | 5,6±0,10 |
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 8533 | 94,52 | 4,4±0,19 |
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 8534 | 64,29 | 4,4±0,12 |
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 8535 | 135,56 | 4,5±0,25 |
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 6 | 312,09 | 8,5±0,40 |
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 17 | 203,38 | 8,2±0,50 |
| <i>P. syringae</i> (“ <i>P. lupini</i> ”) 22 | 21,29 | 2,0±0,10 |

Автор искренне благодарна за помощь в проведении исследований ведущему научному сотруднику, д-р биол. наук, с.н.с. отдела антибиотиков ИМВ НАН Украины И.В. Драговозу, канд. биол. наук, с.н.с. отдела антибиотиков ИМВ НАН Украины В.В. Ключко, канд. биол. наук, с.н.с. отдела общей и почвенной микробиологии ИМВ НАН Украины Н.О. Леоновой и канд. биол. наук, с.н.с. отдела общей и почвенной микробиологии ИМВ НАН Украины Л.А. Белявской.

Л.А. Данкевич

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

СИНТЕЗ ПАТОГЕННИМИ ДЛЯ БОБОВИХ КУЛЬТУР БАКТЕРІЯМИ РОДУ *PSEUDOMONAS* ГОРМОНІВ, ЩО ІНГІБУЮТЬ РІСТ І РОЗВИТОК РОСЛИН

Резюме

Вивчена здатність патогенних для бобових культур патогенів роду *Pseudomonas* продукувати етилен і абсцизову кислоту *in vitro*. Виявлено, пряма залежність між рівнем продукції етилену збудником бактеріального опіку гороху — *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* і рівнем його агресивності для рослин. Показано, що кількість абсцизової кислоти синтезованої патогенними для бобових культур бактеріями роду *Pseudomonas*, як правило, корелює з їх агресивністю на рослинах.

Ключові слова: етилен, абсцизова кислота, бактерії роду *Pseudomonas*, бобові культури.

L. A. Dankevych

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

PRODUCTION OF INHIBITING PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT HORMONES BY PATHOGENIC FOR LEGUMES *PSEUDOMONAS* GENUS BACTERIA

Summary

It has been studied the ability of pathogenic for legumes pathovars of *Pseudomonas* genus to produce ethylene and abscisic acid *in vitro*. A direct correlation between the level of ethylene production by agent of

bacterial pea burn — *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* and level of its aggressiveness for plants has been found. It is shown that the amount of abscisic acid synthesized by pathogenic for legumes *Pseudomonas* genus bacteria correlates with their aggressiveness for plants.

The paper is presented in Russian

Key words: ethylene, abscisic acid, bacteria of *Pseudomonas* genus, legumes.

The authors' address: *Dankevych L.A.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Данкевич Л.А. Фенотипні та генотипні властивості збудника бурої бактеріальної плямистості люпину // Мікробіол. журн. – 2006. – **68**, № 6. – С. 20–27.
2. Драговоз И.В., Леонова Н.О. Иутинская Г.А. Синтез фитогормонов штаммами *Bradyrhizobium japonicum* различной симбиотической эффективности // Мікробіол. журнал. – 2011. – **73**, № 4. – С. 29–35.
3. Леонова Н.О., Данкевич Л.А. Экзогенні ауксини фітопатогенних та бульбочкових бактерій // Збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології» – 2012. – **4**. – С. 371–376.
5. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. – 78 с.
6. 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.
7. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская И.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиология и биохимия культ. Растений. – 1987. – **19**, № 2. – С. 210–215.
8. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения икроорганизмов // Прикл. Биохимия и микробиология. – 2006. – **42**, № 3. – С. 261–268.
9. 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**, N 2. – P. 266–292.
10. Dankevich L.A., Leonova N.O., Dragovoz I.V. Phytohormones's synthesis ability of pathogenic for legumes bacteria of *Pseudomonas* genus *in vitro* // Programme and abstracts of 3-rd international symposium «Intracellular signaling and bioactive molecules design», Lviv 17-23 of September, 2012. – P. 59.
11. Nagahama K., Yoshino K., Matsuoka M., Sato M., Tanase S., Ogawa T. Ethylene production by strains of plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presence of indigenous plasmids carrying homologous gene for the ethylene-forming enzyme // Microbiology – 1994. – N 140. – P. 2309–2313.
12. Weingart H., Volksh B. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars *in vitro* and *in plants* // Applied and Environmental Microbiol. – 1997. – **63**, N 1. – P. 156–161.

Отримано 28.11.2012