

СИНТЕЗ ПОЗАКЛІТИННИХ АУКСИНІВ ПАТОГЕННИМИ ДЛЯ БОБОВИХ КУЛЬТУР БАКТЕРІЯМИ РОДУ *PSEUDOMONAS* ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

Л.А. Данкевич

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ, вул.
Академіка Заболотного, 154, 03143, Україна,
ldankevich@ukr.net

Мета. Дослідити кількісний і якісний склад позаклітинних ауксинів, синтезованих патогенними для бобових культур бактеріями роду *Pseudomonas*, за умов відсутності або присутності попередника синтезу у середовищі культивування. **Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були ізольовані і колекційні штами невалідних таксонів бактерій, патогенних для люпину – „*Pseudomonas lupini*” і „*Pseudomonas xanthochlora*”, а також колекційні та типові штами патогенних для бобових бактерій роду *Pseudomonas*. Патогенні властивості вивчали за допомогою фітопатологічних та мікробіологічних методів. Для визначення якісного та кількісного складу ауксинів у культуральних рідинах фітопатогенних бактерій використовували фізико-хімічні методи. **Результати.** Виявлено різницю між спектром синтезованих патогенними для бобових культур представниками роду *Pseudomonas* ауксинів та їх кількістю за різних умов культивування. Показано, що більшість штамів „*P. lupini*” і типові представники патогенних для бобових патоварів видів *P. syringae* і *P. savastanoi* синтезують широкий спектр індольних сполук. Натомість, більшість штамів „*P. xanthochlora*” і типовий штам *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T синтезують, переважно, значні кількості індоліл-3-оцтової кислоти і індол-3-карбоксілової кислоти. Встановлено, що кількість синтезованих ауксинів дослідженими штамми пов'язана із спектром уражуваних рослин і рівнем агресивності на рослинах-господарях. **Висновки.** За умов відсутності попередника синтезу ауксинів – триптофану базовий рівень синтезу цих індольних сполук у більшості досліджених штамів зберігається, що свідчить про пластичність їх метаболізму. Простежується зв'язок між шляхами взаємодії з рослиною та кількістю, спектром синтезованих ауксинів. Встановлено, що рівень синтезу ауксинів дослідженими бактеріями, які викликають хвороби бобових культур, корелює з їх патогенними властивостями.

Ключові слова: фітопатогенні бактерії, „*P. lupini*”, „*P. xanthochlora*”, ауксини, індоліл-3-оцтова кислота.

Ауксини – це похідні індольних сполук, що регулюють ріст і розвиток рослин. Найбільш відомою серед цих сполук є індоліл-3-оцтова кислота (ІОК). Відомо, що рослини здатні продукувати інші речовини з ауксиноюю активністю, які переважно є індолами, близькими за будовою до ІОК [1, 2]. Ауксини відіграють важливу роль не тільки у регуляції ключових фізіологічних процесів у рослині, а й беруть участь у рослинно-мікробних взаємодіях [3, 4, 5]. Зокрема, відомо, що синтез цих індольних сполук як складових для інфікування рослинних тканин є достатньо розповсюдженим у фітопатогенних бактерій [5, 6]. Найбільш

грунтовно вивчений синтез ауксинів у патогенних для рослин бактерій, що здатні індукувати проліферацію рослинних тканин [5]. Натомість, відомості про продукування цих індолних сполук бактеріями, що викликають некрози, хлорози, в'янення або гниття рослин, є обмеженими [7]. Зокрема, на сьогодні існують наступні уявлення про вплив ауксинів, синтезованих фітопатогенними бактеріями, що не індукують пухлини, на розвиток хвороби. По-перше, екзогенні ауксини можуть порушувати цілісність клітинної стінки у рослин, що є природним бар'єром проти патогенів. Вони стимулюють швидкий ріст клітин рослин за рахунок їх розтягнення («кислий ріст»). Три види ферментів клітинної стінки беруть участь у «кисломому рісті» клітин: ендо- β -1,4-глюканаза, ксілоглюкан-ендо-трансглюкозилаза і ферменти розпаду [8]. Експресія генів перших двох ферментів може індукуватися ауксинами фітопатогенних бактерій, що призводить до порушення міцності структури клітинної стінки шляхом гідролізу полісахаридів, що входять до її складу [9], які, в свою чергу, можуть слугувати ідеальним джерелом живлення для патогенів з метою їх виживання і подальшого поширення [10]. По-друге, екзогенні ауксини патогенних для рослин бактерій беруть участь у роботі продохів, забезпечуючи в такий спосіб шляхи вторгнення деяких фітопатогенів в тканини рослин [11, 12]. І нарешті, ІОК-сигналінг може бути антагоністичним до SAR-опосередкованого шляху формування стійкості рослин до хвороб (systemic acquired resistance)[13, 14, 15].

Рослини, як і мікроорганізми, здатні синтезувати ІОК різними шляхами. Залежно від того, чи потрібен для синтезу попередник – триптофан, біосинтез ІОК поділяється на триптофан-залежні і триптофан-незалежні шляхи. Триптофан-залежний біосинтез даної сполуки передбачає щонайменше шість різних шляхів: через індол-3-ацетамід, індол-3-піруват, триптамін, індол-3-ацетальдоксим, індол-3-ацетонітрил і за рахунок окиснення бічного ланцюга триптофану [1, 3, 4]. У індол-3-ацетамідному (ІАМ) шляху триптофан перетворюється на індол-3-ацетамід за допомогою триптофан-2-монооксигенази з наступною його трансформацією до індоліл-3-оцтової кислоти за участю гідролази. Індол-3-ацетамідний шлях синтезу ІОК – найбільш досліджений у бактерій. Зокрема, даний спосіб утворення ІОК характерний для багатьох патогенних для рослин представників роду *Pseudomonas*, а також видів *Agrobacterium tumefaciens*, *Pantoea agglomerans* [7, 14]. У індол-3-піруватному (МПА) шляху спочатку відбувається переамінування триптофану за допомогою амінотрансферази до індол-3-пірувату. На наступному етапі індол-3-піруват декарбоксілюється у індол-3-ацетальдегід за допомогою індол-3-піруват-декарбоксилази. На останньому етапі індол-3-ацетальдегід окиснюється до індоліл-3-оцтової кислоти. Синтез ІОК через індол-3-піруват був описаний у широкого кола бактерій. Вважають, що такий спосіб біосинтезу ІОК властивий епіфітним і ризосферним бактеріям. Серед фітопатогенних бактерій це представники видів, що можуть перебувати як у епіфітному, так і патогенному стані, зокрема, штами виду *P. agglomerans* [6]. Крім того, деякі дослідники встановили здатність синтезувати індоліл-3-оцтову кислоту як через індол-3-піруватний, так і індол-3-ацетамідний шлях у окремих штамів виду *Pseudomonas syringae*, що здатні викликати пухлиноутворення різних видів дерев [10, 6]. У триптаміновому шляху

у мікроорганізмів триптофан за рахунок ферменту триптофан декарбоксілази декарбоксілюється до триптаміну на першому етапі. На другому етапі триптамін проходить через дві стадії окиснення з утворенням ІОК. Дані про наявність цього шляху біосинтезу ІОК у фітопатогенних бактерій вкрай обмежені [6]. Відомо, що існує два способи біосинтезу індоліл-3-оцтової кислоти за індол-3-ацетонітрильним шляхом: один – через індолні глюкозилати, а інший – через індол-3-ацетальдоксим. Слід також відмітити, що відомості про використання бактеріями індол-3-ацетальдоксिमного шляху для біосинтезу індоліл-3-оцтової кислоти відсутні. Серед фітопатогенних бактерій нітрілазна ферментативна активність, характерна для індол-3-ацетонітрильного шляху, встановлена у *A. tumefaciens*. Але дослідники вважають, що в даному випадку перетворення індол-3-ацетонітрилу у індоліл-3-оцтову кислоту відбувається через індол-3-ацетамід. Шлях окиснення бічного радикалу триптофану є унікальним для мікроорганізмів. За цим шляхом триптофан безпосередньо перетворюється в індол ацетальдегід з наступною його трансформацією до індоліл-3-оцтової кислоти за допомогою індол ацетальдегід дегідрогенази. Ключовий фермент даного шляху біосинтезу був виявлений в умовно патогенного для рослин виду *Pseudomonas fluorescens* [4, 6].

Як рослини, так і мікроби можуть використовувати триптофан-незалежний шлях синтезу ІОК. Ключовим попередником синтезу в даному шляху є індол-3-гліцерофосфат або індол. Але остаточний шлях синтезу індоліл-3-оцтової кислоти в такий спосіб ще не встановлений. Дані щодо синтезу ІОК фітопатогенними бактеріями даним шляхом вкрай обмежені.

Зважаючи на зазначене вище, метою наших досліджень було вивчення кількісного і якісного складу позаклітинних ауксинів, патогенних для бобових культур бактерій роду *Pseudomonas*, синтезованих триптофан-залежним і триптофан-незалежним шляхом.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були ізольовані і колекційні штами невалідних таксонів, патогенних для люпину бактерій роду *Pseudomonas*: „*Pseudomonas lupini*” 8531, 8532, 8533, 8534, 8535, 17, 6, 22 і „*Pseudomonas xanthochlora*” 8540, 3л, 9л. У роботі також використовували наступні колекційні та типові штами фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^Т (NCPPB 281 – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland), ICMP 3023 (International Collection of Microorganisms From Plant, New Zealand), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-112 (NCPPB 52, ICMP 2740), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^Т (ICMP 2452, NCPPB 2585), *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^Т (NCPPB 667, ICMP 3553), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 (NCPPB 1139). Штам *P. savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^Т (NCPPB 639, ICMP 4352), що здатен викликати утворення пухлин у рослин родини *Oleaceae*, а відтак і синтезувати ауксини, був включений у дослідження як контрольний. Вірулентні властивості штамів досліджували методом штучного зараження рослин водною суспензією одно (двох) добових клітин бактерій (10^7 кл/мл). Облік вірулентності штамів проводили на сьому добу за розробленою нами раніше 10-ти бальною шкалою [16].

Патогенні для бобових культур бактерії роду *Pseudomonas* культивува-

ли на мінеральному середовищі Омелянського (H_2O дистильована – 1 л.; K_2HPO_4 – 1 г.; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1 г.; MgSO_4 – 0,5 г.; CaCl_2 – 0,1 г.; NaCl і FeSO_4 – слідові кількості) протягом 24 годин в колбах об'ємом 750 мл на качалці (220 об/хв) за 26-28°C. Для визначення спектру позаклітинних ауксинів до середовища культивування додавали або ні 0,1% триптофану. Для відділення біомаси культуральні рідини бактерій центрифугували впродовж 20 хв при 9000 об/хв і температурі +4°C. Надосадові рідини використовували для подальших досліджень, а осад клітин суспендували в дистильованій воді, потім висушували при 103-105°C у сушильній шафі до постійної ваги. Кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) мікроорганізмів визначали ваговим методом. Визначення якісного та кількісного складу фітогормонів у культуральних рідинах фітопатогенних бактерій здійснювали методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [17]. Позаклітинні ауксини виділяли із надосадових рідин фітопатогенних бактерій шляхом екстракції фітогормонів етиловим ефіром оцтової кислоти при рН 3,0. Отримані екстракти випарювали під вакуумом при 40-45°C. Сухий залишок розчиняли у етанолі, переносили у мікропробірки. Етанольні екстракти надосадових рідин досліджуваних бактерій використовували для накопичувальної тонкошарової хроматографії. Кількісне визначення ауксинів проводили за допомогою сканувального спектроденситометра «*Sorbfil*» (Російська Федерація). У дослідженнях використовували синтетичні стандарти фітогормонів фірми *Sigma-Aldrich* (Німеччина) та *Acros Organic* (Бельгія). Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програм Excel.

Результати. Встановлено, що за умов додавання до середовища культивування попередника синтезу ауксинів – триптофану, майже 100% синтезованих штамом *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T ауксинів припадає на ІОК і індол-3-карбоксілову кислоту (рис.1А).

Слід відмітити, що включені у дослідження представники патоварів *phaseolicola*, *pisi*, *syringae* синтезують середні кількості як індоліл-3-оцтової і індол-3-карбоксілової кислот, так і індол-3-оцтової кислоти гідразиду (від 41,5–58,3 до 39,71–53,1% від загальної кількості ауксинів) (рис.1А). Нами також показано, що синтез ауксинів пухлиноіндукуючим штамом *P. savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T відбувається поступово, відповідно: 344,67 мг/г АСБ – перша доба культивування та 1893,24 мг/г АСБ – друга доба культивування. Даний штам синтезує практично у рівній кількості як індоліл-3-оцтову і індол-3-карбоксілову кислоту, так і індол-3-карбоксі-альдегід (56,05 та 42,5% від загальної кількості ауксинів) (рис.1А). Натомість, за умов додавання до середовища культивування триптофану *P. syringae* pv. *syringae* В-1027^T, *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T вже на першу добу культивування синтезують значні кількості ауксинів (рис.1А). В ході досліджень також підтверджена встановлена нами раніше кореляція [18] між рівнем синтезу фітопатогенними бактеріями ауксинів та їх патогенними властивостями. Зокрема показано, що штамми, які здатні уражувати широкий спектр рослин (поліфаги) – *P. syringae* pv. *syringae* В-1027^T, *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T та *P. savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T, синтезують значно вищі рівні ауксинів (від 1987,91 до 1362,46 мг/г АСБ) порівняно з фітопатогенними бактеріями, що ви-

кликають хворобу виключно однієї рослини-господаря (монофаги) – *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* В-1123^Т, *P. syringae* pv. *pisi* 9177^Т (від 825,87 до 1267,5 мг/г АСБ) (табл.1). За умов відсутності попередника синтезу у середовищі культивування якісні та кількісні показники синтезованих ауксинів дещо змінюються (рис.1Б). Зокрема, базовий рівень синтезу ауксинів зберігається у штамів *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^Т,

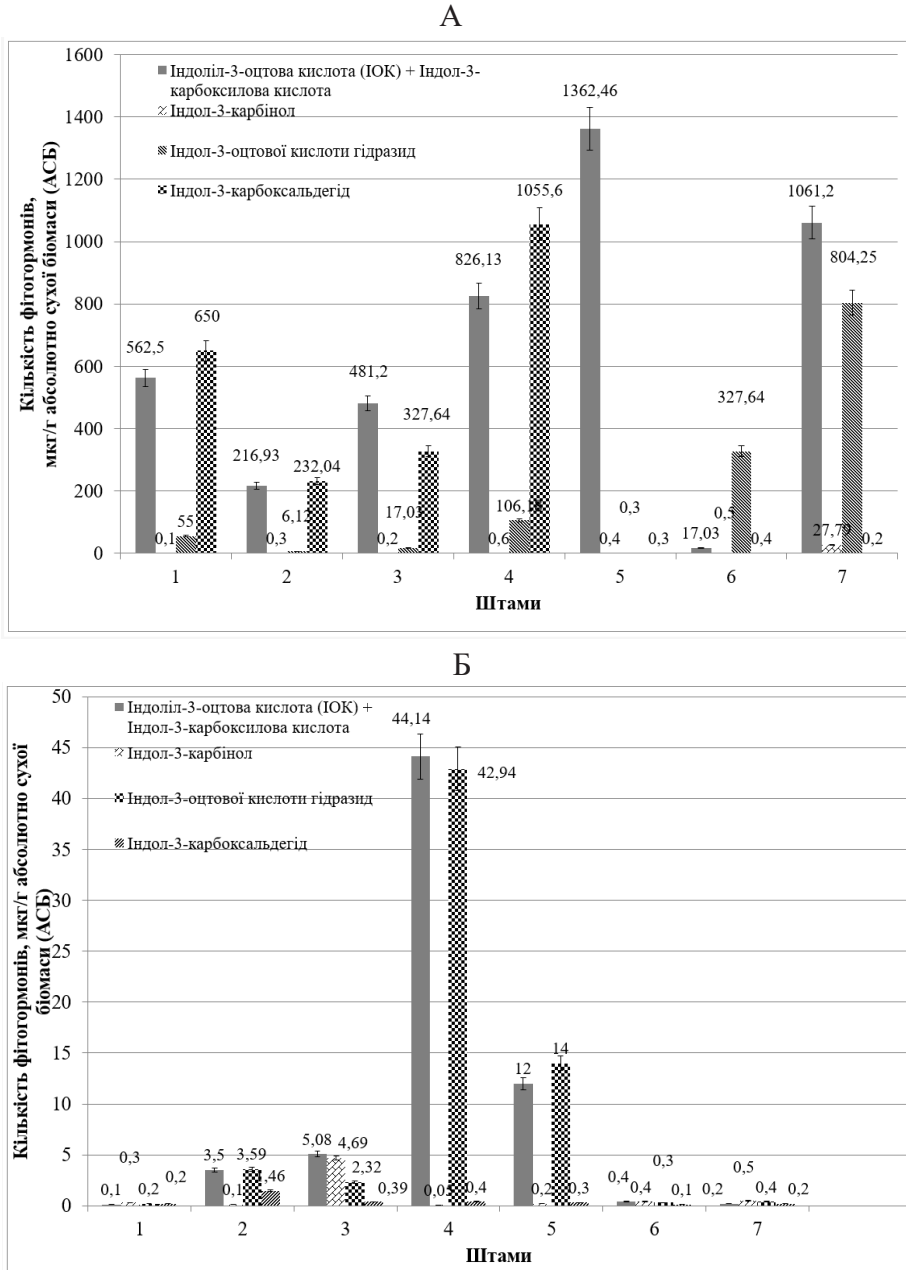


Рис.1. Синтез позаклітинних ауксинів патогенними для бобових культур представниками роду *Pseudomonas* за умов присутності (А) та відсутності (Б) попередника синтезу у середовищі культивування: 1 – *P. syringae* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123^Т, 2 – *P. syringae* pv. *glycinea* 8571, 3 – *P. syringae* pv. *pisi* 9177^Т, 4 – *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^Т, 5 – *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^Т, 6 – *P. savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^Т (1 доба культивування), 7 – *P. savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^Т (2 доби культивування).

P. marginalis pv. *marginalis* 9175^T, *P. syringae* pv. *pisi* 9177^T, *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8571. Найвищі кількості ауксинів продукують саме штами *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T (26,0–86,54 мкг/г АСБ), які є класичними поліфагами (рис.1Б). Отримані результати ще раз підтверджують важливість ауксинів, синтезованих фітопатогенними бактеріями, у процесах інфікування рослин [2, 3]. Крім того, ці штами синтезують майже однакові кількості індоліл-3-оцтової, індол-3-карбокислової кислот і індол-3-оцтової кислоти гідразиду. Слід відмітити, що у *P. syringae* pv. *pisi* 9177^T, *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8571 присутній, хоча і в незначних кількостях, дещо ширший спектр індольних сполук. Також нами був досліджений якісний і кількісний склад ауксинів, синтезованих двома збудниками основних бактеріальних хвороб люпину – „*Pseudomonas lupini*” (збудник бурої бактеріальної плямистості люпину) та „*Pseudomonas xanthochlora*” (збудник мокромо водянистого гниття) за умов присутності та відсутності триптофана у середовищі культивування (рис 2А і 2Б).

За умов додавання попередника синтезу у середовище культивування штами збудника бурої бактеріальної плямистості люпину синтезували увесь спектр включених у дослідження ауксинових сполук. Слід також зазначити, що кількість індоліл-3-оцтової та індол-3-карбокислової кислот не завжди є превалюючою у загальному пулі синтезованих ауксинів. Зокрема, кількість даних сполук у штамів „*P. lupini*” коливається від 12,42%

Таблиця 1

Порівняльна характеристика продукування позаклітинних ауксинів патогенними для бобових культур типовими та колекційними штамми бактерій роду *Pseudomonas* та рівня їх агресивності на рослинах

Штами	Кількість фітогормонів, мкг/г абсолютно сухої біомаси (АСБ)		Середній рівень агресивності штамів на рослинах господарях, бали
	за присутності попередника синтезу у середовищі	за відсутності попередника синтезу у середовищі	
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> В-1123 ^T	1267,5	-	7,3±0,10
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> 8571	455,09	8,55	6,0±0,59
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> 9177 ^T	825,87	12,48	9,0±0,40
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> В-1027 ^T	1987,91	86,54	8,3±0,25
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> 9175 ^T	1362,46	26,0	7,7±0,1
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 9174 ^{T*} (перша доба культивування)*	344,67	-	7,3±0,25
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 9174 ^T (друга доба культивування)	1893,24	-	

Примітка: «-» – не виявлено

до 54,01% від загальної кількості синтезованих ауксинів. Крім того, нами виявлено, що середньоагресивний штам „*P. lupini*” 8531 та високоагресивні штами „*P. lupini*” 6 і „*P. lupini*” 17 здатні синтезувати значні кількості індол-3-карбінолу (від 33,25% до 69,64% від загальної кількості синтезованих ауксинів) (рис.2А).

Даний факт, напевно, свідчить про те, що індоліл-3-оцтова кислота, можливо, відіграє роль сигнальної молекули, що активує ланцюг інших механізмів вірулентності, а не ключового фактора патогенності.

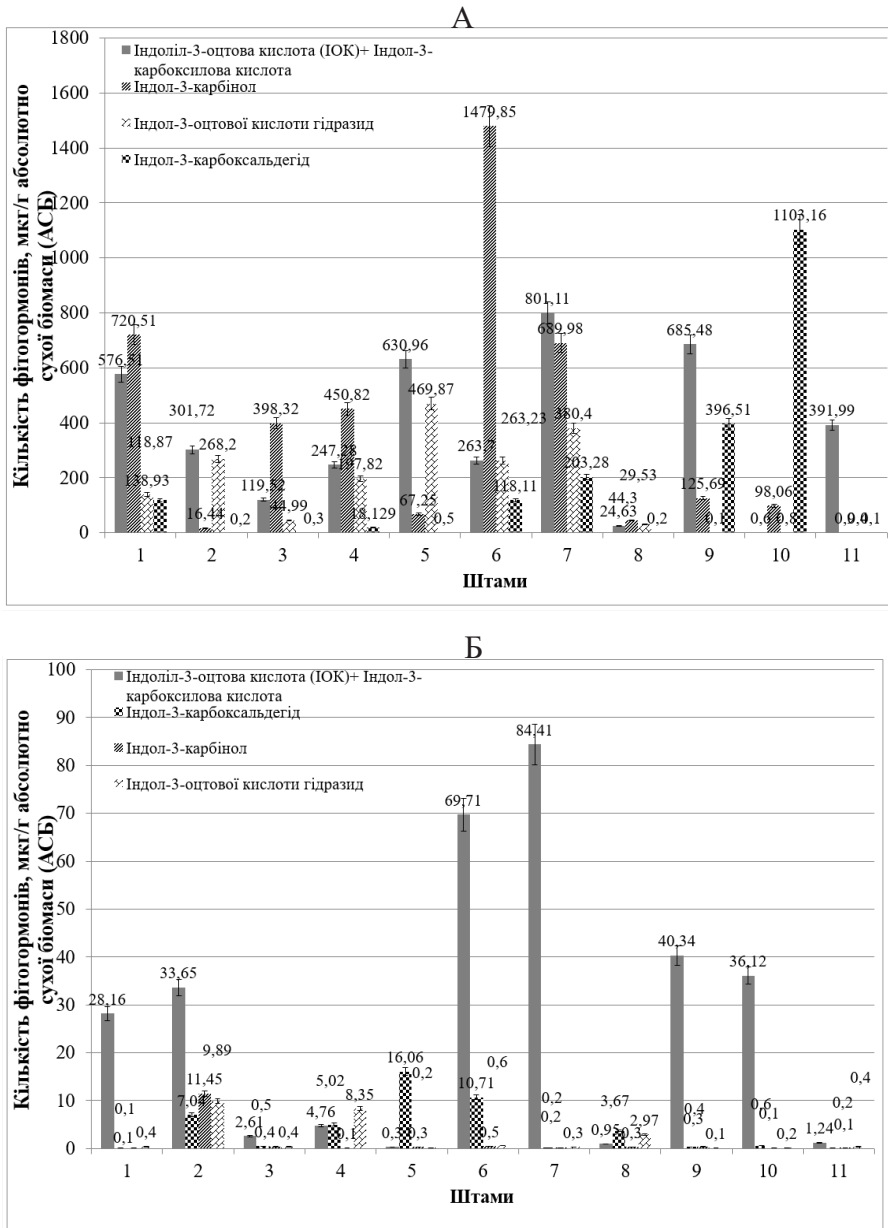


Рис. 2. Синтез позаклітинних ауксинів невалідними таксонами *Pseudomonas* за умов присутності (А) та відсутності (Б) попередника синтезу у середовищі культивування: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – «*P. lupini*» 8531, 8532, 8533, 8534, 8535, 6, 17, 22 і 9, 10, 11 – «*P. xanthochora*» 8540, 3л, 9л

На наш погляд, простежується певна подібність між спектром синтезованих ауксинів збудником бурої бактеріальної плямистості люпину та аналогічним показником у представників виду *P. syringae*. В ході досліджень також виявлено, що як високоагресивний штам „*P. xanthochlora*” 8540, так і низькоагресивний штам „*P. xanthochlora*” 9л синтезують значні кількості індоліл-3-оцтової та індол-3-карбоксилової кислот (від 56,76 до майже 100% від загальної кількості синтезованих ауксинів). Натомість, високоагресивний штам „*P. xanthochlora*” 3л продукує значні кількості індол-3-карбінолу – 91,8% від загальної кількості синтезованих ауксинів. Ймовірно, така значна кількість індол-3-карбінолу, що, як відомо, утворюються з глюкозилатів, свідчить про здатність даного штаму синтезувати ауксини також і через індол-3-ацетонітрильний шлях. Крім того, подібність хімічної структури індол-3-карбінолу до індоліл-3-оцтової та індол-3-карбоксилової кислот свідчить про можливість їх взаємоперетворення [6]. За умов відсутності попередника синтезу у середовищі культивування рівень синтезу ауксинів штамми „*P. lupini*” та „*P. xanthochlora*” суттєво знижується (рис.2А). Також змінюється і характер синтезу ауксинів даними збудниками. Здатність до синтезу широкого спектру індольних сполук зберігається майже у всіх штамів „*P. lupini*” за виключенням „*P. lupini*” 8531 та 6. У цих штамів майже 100% від загальної кількості синтезованих ауксинів складають індоліл-3-оцтова та індол-3-карбоксилова кислоти. Цей факт ще раз підтверджує важливість даних сполук у взаємодії фітопатоген–рослина [6]. В ході досліджень також виявлено, що як високоагресивні „*P. xanthochlora*” 8540, 3л, так і низькоагресивний штам „*P. xanthochlora*” 9л за умови відсутності триптофана у середовищі культивування синтезують виключно індоліл-3-оцтову та індол-3-карбоксилову

Таблиця 2

Порівняльна характеристика продукування позаклітинних ауксинів невалідними таксонами фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* та рівня їх агресивності на рослинах

Штами	Кількість фітогормонів, мкг/г абсолютно сухої біомаси (АСБ)		Середній рівень агресивності штамів на рослинах господарях, бали
	за присутності попередника синтезу у середовищі	за відсутності попередника синтезу у середовищі	
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 8531	1554,82	28,16	6,6±0,23
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 8532	586,36	62,03	5,6±0,10
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 8533	562,83	2,61	4,4±0,19
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 8534	914,05	18,13	4,4±0,12
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 8535	1168,08	16,06	4,5±0,25
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 6	2124,89	80,42	8,5±0,40
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 17	2074,77	84,41	8,2±0,50
<i>P. syringae</i> (« <i>P. lupini</i> ») 22	98,46	7,59	2,0±0,10
« <i>P. xanthochlora</i> » 8540	1207,68	40,34	7,7±0,25
« <i>P. xanthochlora</i> » 3л	1201,22	36,12	7,0±0,1
« <i>P. xanthochlora</i> » 9л	391,99	1,24	2,0±0,5

кислоти (близько 100% від загальної кількості ауксинів). В ході досліджень відмічено також пряму кореляцію між рівнем агресивності штаму на рослинах та кількістю синтезованих ауксинів (табл.2).

Зокрема, за умов додавання триптофану до середовища культивування низькоагресивні штами „*P. xanthochlora*” продукували у понад 3 рази менші кількості ауксинів, ніж високоагресивні. Аналогічна закономірність спостерігається і у ізольованих нами „*P. lupini*”. Так, низькоагресивний штам „*P. lupini*” 22 синтезував у понад 21 раз менше ауксинів, ніж високоагресивні штами „*P. lupini*” 6 і 17. Натомість, серед середньоагресивних та низькоагресивних колекційних штамів „*P. lupini*” відмічена кореляція між рівнем агресивності та загальною кількістю синтезованих ауксинів простежується не настільки чітко. Зокрема, середньоагресивний штам „*P. lupini*” 8531 синтезує від 1,3 до 2,8 разів більше ауксинів порівняно з низькоагресивними штамами „*P. lupini*” 8533, 8534, 8535. Натомість, інший середньоагресивний штам „*P. lupini*” 8532, хоча і має дещо вищий порівняно з низькоагресивним штамом „*P. lupini*” 8533 рівень синтезу ауксинів, але він є значно нижчим порівняно з низькоагресивними штамами „*P. lupini*” 8534, 8535 (від 1,62 до 2,07 рази). Нами також відмічено, що зв'язок між агресивністю штаму та рівнем синтезу ним ауксинів є закономірним і за умов відсутності триптофану у середовищі культивування. Зокрема, високоагресивні штами „*P. lupini*” 6 і 17 синтезують у 8,5, а середньоагресивні – у 2,16 рази більше ауксинів, ніж низькоагресивні. До того ж кількість синтезованих низькоагресивним штамом „*P. xanthochlora*” 9л ауксинів майже у 60 раз менша, ніж високоагресивними „*P. xanthochlora*” 8540, 3л (табл.2).

Обговорення. Як зазначалося вище, основними шляхами для триптофан-залежного біосинтезу фітопатогенними бактеріями ІОК є індол-3-ацетамідний та індол-3-піруватний. Крім того, деякі бактерії використовують одночасно декілька шляхів біосинтезу ІОК. Зокрема, групою американських дослідників показано, що ряд патоварів видів *P. syringae* (pv. *syringae*, pv. *tabaci*, pv. *tomato*) та *P. savastanoi* (pv. *glycinea*, pv. *phaseolicola*) синтезують ключові метаболіти як індол-3-піруватного (індол-3-ацетальдегід), так і індол-3-ацетамідного (індол-3-ацетамід) шляхів. Згідно результатів, наведених даною групою дослідників, усі зазначені вище патовари видів *P. syringae* та *P. savastanoi* здатні синтезувати широкий спектр індолних сполук. Крім того, науковці відмічають, що найбільші кількості ІОК (від 15 до 20 раз більше) продукують представники *P. syringae* pv. *syringae*. Натомість, згідно даних досліджень, штами виду *P. marginalis* синтезують виключно ІОК [19], що узгоджується з отриманими нами результатами (рис. 1А). Подібність отриманих результатів із даними американських колег [19], ймовірно, може свідчити про те, що високий вміст ІОК та, практично, відсутність інших похідних індолних сполук є особливістю представників виду *P. marginalis*. Крім того, отримані нами результати можуть пояснюватися даними літератури, згідно з якими представники патоварів *phaseolicola*, *pisi*, *syringae* здатні синтезувати так звані специфічні фактори патогенності, зокрема фазеолотоксин (pv. *phaseolicola*), сирінгоміцин (pv. *pisi*, pv. *syringae*) [20]. Синтез цих токсинів безпосередньо пов'язаний із продукуванням екзо-

генних ауксинів. Так, встановлено, що мутантні за синтезом ІОК штами *P. syringae* pv. *syringae* мали значно знижену здатність продукувати сірінгомідин, а відтак, і вірулентність [21]. Ймовірно, ауксини (зокрема ІОК) представників патоварів *phaseolicola*, *pisi*, *syringae* відіграють, скоріше, роль сигнальних молекул, що активують ряд інших реакцій і шляхів розвитку інфікування і перебігу хвороби рослин, ніж ключових факторів патогенності. Крім того, відомості про зв'язок між синтезом ауксинів і участю специфічних факторів або механізмів патогенності у представників виду *P. marginalis* в літературі майже відсутні. А синтез штамом *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T значних кількостей індоліл-3-оцтової і індол-3-карбоксилової кислоти, на наш погляд, може бути пов'язаний як з особливостями взаємодії з рослиною (використання даної сполуки як ключового фактору патогенності), так і з біологією даного виду, що здатен уражувати широкий спектр рослин. Синтез значних кількостей ауксинів штамом *P. savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T лише на другу добу культивування, ймовірно, свідчить про те, що дані сполуки індукують поступові зміни у гормональній регуляції рослин, що, в кінцевому результаті, призводить до стимуляції проліферації рослинних клітин. Зростання синтезу вже на першу добу культивування ауксинів штамми *P. syringae* pv. *syringae* В-1027^T, *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T не суперечить даним літератури та свідчить про можливість використання цих індольних сполук як ключових факторів вірулентності, які швидко порушують систему гормональної регуляції рослин, що ініціює початок розвитку процесу їх інфікування та розвитку хвороби [5].

Збереження базового рівня синтезу ауксинів досліджуваними штамми за умов відсутності попередника синтезу цілком узгоджується з даними літератури та свідчить про пластичність метаболічних процесів у мікроорганізмів [3, 4]. Зокрема, окремі дослідники констатують, що зворотна інактивація найбільш розповсюджених шляхів біосинтезу ІОК призводить до зниження продукції даної сполуки майже на 90%. Але жодних мутантів, у яких повністю був би відсутній синтез ІОК, не може бути створено, оскільки у мікроорганізмів є кілька шляхів синтезу даної індольної сполуки [2, 4].

Виявлена нами подібність спектрів індольних сполук між штамми „*P. lupini*” та патоварами виду *P. syringae*, а також між штамми *P. xanthochlora*” та представниками виду *P. marginalis* може опосередковано свідчити про їх спорідненість та не суперечить отриманим нами раніше результатам [16, 22]. Зокрема, встановлена суттєва фенотипова та генотипова спорідненість штамів „*P. lupini*” та окремих патоварів видів *P. syringae*, а також штамів *P. xanthochlora*” та *P. marginalis* [16, 22].

Отже, в ході досліджень виявлено та охарактеризовано різницю між спектром синтезованих патогенними для бобових культур представниками роду *Pseudomonas* ауксинів та їх кількістю за умов присутності та відсутності попередника синтезу у середовищі культивування. Встановлено, що за умов відсутності попередника синтезу ауксинів (триптофану) базовий рівень синтезу цих індольних сполук у більшості досліджених штамів зберігається. Отримані дані свідчать про пластичність метаболізму цієї фізіологічної групи мікроорганізмів. Крім того, незалежно від умов культивування показано кореляцію між кількісним і якісним скла-

дом синтезованих ауксинів та шляхом взаємодії збудників бактеріальних хвороб з рослинами. Зокрема, більшість штамів „*P. lupini*” і типові представники патогенних для бобових патоварів видів *P. syringae* і *P. savastanoi* синтезують низький та середній рівні індоліл-3-оцтової кислоти і індол-3-карбоксілової кислоти, для яких дані сполуки можуть відігравати роль сигнальних молекул, що запускають каскад інших механізмів патогенності, ніж ключових факторів вірулентності. Натомість, для штамів „*P. xanthochlora*” і типового штаму *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T синтез цих індолних сполук відіграє вирішальну роль у процесі їх взаємодії з рослиною. Також виявлено, що рівень синтезу ауксинів бактеріями, що викликають хвороби бобових культур, прямо корелює з їх здатністю уражувати широке чи обмежене коло рослин. На прикладі двох збудників бактеріальних хвороб люпину – бурої бактеріальної плямистості та мокрого водянистого гниття люпину встановлено пряму кореляцію між рівнем агресивності штаму на рослинах та кількістю синтезованих ауксинів.

Подяка. Автор щиро вдячна за допомогу у проведенні досліджень: доктору біологічних наук, провідному науковому співробітнику відділу антибіотиків ІМВ НАН України І.В. Драговозу, кандидату біологічних наук, старшому науковому співробітнику відділу загальної і ґрунтової мікробіології ІМВ НАН України Н.О. Леоновій, кандидату біологічних наук, старшому науковому співробітнику відділу загальної і ґрунтової мікробіології ІМВ НАН України Л. О. Білявській.

СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ АУКСИНОВ ПАТОГЕННЫМИ ДЛЯ БОБОВЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS* ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Л.А. Данкевич

*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154,
Киев, 03143, Украина,
ldankevich@ukr.net*

Резюме

Цель. Исследовать количественный и качественный состав внеклеточных ауксинов, синтезированных патогенными для бобовых культур бактериями рода *Pseudomonas*, в условиях отсутствия или присутствия предшественника их синтеза в среде культивирования. **Материалы и методы.** Объектами исследования были изолированные и коллекционные штаммы невалидных таксонов бактерий, патогенных для люпина – «*Pseudomonas lupini*» и «*Pseudomonas xanthochlora*», а также коллекционные и типовые штаммы патогенных для бобовых бактерий рода *Pseudomonas*. Патогенные свойства изучали с помощью фитопатологических и микробиологических методов. Для определения качественного и количественного состава ауксинов в культуральных жидкостях фитопатогенных бактерий использовали физико-химические методы. **Результаты.** Выявлены различия между спектром синтезированных патогенными для бобовых культур представителями рода *Pseudomonas* ауксинов и их количеством при различных условиях культивирования. Показано, что большинство штаммов «*P. lupini*» и типичные представители патогенных для бобовых

патогенов видов *P. syringae* и *P. savastanoi* синтезируют широкий спектр индольных соединений. В свою очередь, большинство штаммов «*P. xanthochlora*» и типовой штамм *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T синтезируют преимущественно значительные количества индолил-3-уксусной и индол-3-карбоксиловой кислот. Выявлено, что количество синтезируемых ауксинов исследованными штаммами зависит от спектра поражаемых растений и их уровня агрессивности на растениях-хозяевах. **Выводы.** В условиях отсутствия предшественника синтеза ауксинов – триптофана базовый уровень синтеза этих индольных соединений у большинства исследованных штаммов сохраняется, что свидетельствует о пластичности их метаболизма. Наблюдается связь между путями их взаимодействия с растением и количеством, спектром синтезированных ауксинов. Установлено, что уровень синтеза ауксинов исследованными бактериями, вызывающими болезни бобовых культур, коррелирует с их патогенными свойствами.

Ключевые слова: фитопатогенные бактерии, «*P. lupini*», «*P. xanthochlora*», ауксины, индолил-3-уксусная кислота.

SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR AUXINS BY PATHOGENIC FOR LEGUMES BACTERIA BELONGS TO THE GENUS *PSEUDOMONAS* UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF CULTIVATION

L.A. Dankevich

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
154 Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Aim. The quantity and quality composition of extracellular auxin synthesized by pathogenic for legumes bacteria belongs to the genus *Pseudomonas* in the absence or presence of precursor in the cultivation medium has been investigated. **Materials and methods.** The objects of study were isolated and collection strains are pathogenic for lupine not valid bacterial taxa – “*Pseudomonas lupini*” and “*Pseudomonas xanthochlora*” as well as collections and typical strains of pathogenic bacteria for legume bacteria belongs to genus *Pseudomonas*. Pathogenic properties were studied using phytopathological and microbiological methods. To determine the qualitative and quantitative composition of auxin in the culture liquid of pathogenic bacteria were performed using physico-chemical methods. **Results.** The difference between spectrum of synthesized auxins by pathogens for legumes representatives of the genus *Pseudomonas* under different culture conditions and its quantity has been found. It has been shown that most “*P. lupini*” strains and typical representatives of pathogenic for legumes species *P. syringae* and *P. savastanoi* synthesize a wide range of indole compounds. Instead, the most strains of “*P. xanthochlora*” and the typical strain of *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T synthesized mainly significant amounts of indole-3-acetic and indole-3-carboxylic acids. The quantity of synthesized by studied strains auxin associated with range of affected plants and the level of its aggressiveness on the host plants. **Conclusions.** In the absence of auxin precursor synthesis – tryptophan basic synthesis of indole compounds by most studied strains remains, indicating that the plasticity of their metabolism. The relation between the ways of interaction with the plant and the quantity and quality of synthesized auxin has been found. It has been established that the level of auxin synthesis by studied bacteria that cause disease legumes, correlated

with their pathogenic properties.

Keywords: phytopathogenic bacteria, “*P. lupini*”, “*P. xanthochlora*”, auxins, indole-3-acetic acid.

1. Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany*. 2005; 95 (5): 707-735.
2. Mano Y, Nemoto K. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2012; 63(8): 2853-2872.
3. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism - plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; 31(4): 425-448.
4. Spaepen S, Vanderleyden J. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold spring harbor perspectives in biology*. 2011; 3(4): 1-13.
5. Jameson PE. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – an overview. *Plant Growth Regulation*. 2000; 32 (2): 369–380.
6. Fu J, Wang Sh. Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. *Frontiers in plant science*. 2011; 2: 1-7.
7. Glickmann E, Gardan L, Jacquet S, Hussain S, Elasri M, Petit A, Dessaux Y. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1998; 11(2): 156-162.
8. Nafisi M, Fimognari L, Sakuragi Y. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry*. 2015; 112: 63-71.
9. Darley CP, Forrester AM, McQueen-Mason SJ. The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol. Biol*. 2001; 47(1): 179-195.
10. Lindow Steven E, Brandl Maria T. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(4): 1875–1883.
11. Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol*. 2006; 7(5): 303-324.
12. Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, Ottado J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS ONE*; 2009; 4(2) e4358: 1-13.
13. Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(50): 20131-20136.
14. Boivin S, Fonouni-Farde C, Frugie F. How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. *Frontiers in plant science*. 2016; 7: 1-12.
15. Lindow SE, Desurmont C, Elkins R, McGourty G, Clark E, Brandl MT. Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. *Bacteriology*. 1998; 88(11): 1149 – 1157.
16. Dankevych LA. [Phenotypical and genotypical characteristics of the pathogen in lupine bacterial brown spottiness]. *Mirobiol. Zh*. 2006; 68(6): 20-27. Ukrainian.
17. Methodical recommendations by phytohormones definition. Kyiv: Inst. of Botany of NASU. 1988. Russian.
18. Leonova NO, Dankevich LA, Dragovoz IV, Patyka VF, Iutynska GO. [Synthesis of extracellular phytohormones-stimulators by nodule bacteria and bacteria phytopathogenic for soybean]. *Reports of the NASU*. 2013; 3: 165 – 171. Ukrainian.

19. Fett WF, Osman SF, Dunn MF. Auxin production by plant-pathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Applied and Environmental microbiology. 1987; 53(8): 1839-1845.
20. Hwang MSH., Morgan RL, Sarkar SF, Wang PW, Guttman DS. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Applied and environmental microbiology. 2005; 71(9): 5182–5191.
21. Mazzola M, White FF. A mutation in the indole-3-acetic acid biosynthesis pathway of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects growth in *Phaseolus vulgaris* and syringomycin production. Journal of Bacteriology. 1994; 176(5): 1374-1382.
22. Dankevych LA. [Phylogenetic analysis of lupines bacterial wet rot – “*Pseudomonas xanthochlora*”]. Mikrobiol. Zh. 2011; 73(6): 20-24. Ukrainian.

Отримано 15.02.2017