

ОБРАЗОВАНИЕ АУКСИНОВ ЭНДОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ *DACTYLORHIZA MACULATA* (L.) SOO (ORCHIDACEAE)

Впервые установлено, что бактерии р. *Bacillus*, изолированные из подземных органов *Dactylorhiza maculata* – представителя семейства Orchidaceae умеренного климата России, – продуцируют фитогормон индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Уровень ИУК, обнаруженной в культуральной жидкости 12 из 15 изолятов микроорганизмов, находится в пределах 0,3 – 29,0 мкг/мл в зависимости от штамма.

Ключевые слова: орхидные, придаточные корни, стеблекорневой тубероид, эндофитные бактерии, индолил-3-уксусная кислота.

Эндофитные бактерии наряду с микромицетами являются одним из важнейших компонентов системы симбиотических отношений растений семейства Orchidaceae с микроорганизмами [1]. Установлено, что ассоциативные бактерии тропических оранжерейных [2, 3] и дикорастущих [4] орхидных способны продуцировать экзометаболиты, в том числе фитогормоны ауксины, участвующие в регуляции роста и развития растений. Показано, что культуральная жидкость этих бактерий, содержащая индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), активизировала корнеобразование у черенков фасоли [2], а также стимулировала прорастание семян орхидных [3, 4]. Неизученным, и, несомненно, актуальным, является исследование роли эндофитных бактерий в регуляции процессов жизнедеятельности растений семейства Orchidaceae, произрастающих в условиях умеренного климата России. Особый интерес представляют эндофитные спорообразующие бактерии р. *Bacillus*, способные синтезировать широкий спектр биологически активных веществ, стимулирующих рост и развитие растений [5], и являющиеся наиболее активными продуцентами ауксинов среди ассоциированных с орхидными микроорганизмов, что показано на тропических видах [2, 3, 4]. Ранее нами установлено присутствие бактерий р. *Bacillus* в сообществе микроорганизмов, ассоциированных с подземными органами орхидных средней России [6].

Цель настоящей работы – выявить способность синтезировать индолил-3-уксусную кислоту грамположительными спорообразующими бактериями, выделенными из подземных органов пальчатокоренника пятнистого *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo – представителя семейства Orchidaceae флоры России.

Объектами исследования являлись 15 штаммов спорообразующих палочковидных бактерий, предварительно отнесенных к р. *Bacillus*, изолированных ранее [6] из придаточных корней и корневых окон-

чаний тубероидов (запасующих органов) генеративных особей *D. maculata*. Различали старые подземные органы, образовавшиеся в прошлом вегетационном периоде, перезимовавшие и обеспечивающие текущую вегетацию, и молодые – формирующиеся в процессе текущей вегетации. Растения произрастали на территории Ярославской области в молодом злаково-разнотравном березняке с примесью ольхи на дерново-подзолистой суглинистой почве.

Чистые культуры бактерий выделяли на питательной среде Чапека и крахмало-аммиачном агаре при температуре 28°С в разные фазы сезонного развития *D. maculata*: листообразование (май), цветение (июль) и покой (сентябрь). Для изучения способности микроорганизмов синтезировать индолил-3-уксусную кислоту чистые культуры бактерий выращивали в жидкой среде Чапека, в которую вносили 200 мкг/мл D,L-триптофана как прекурсора ИУК [2, 3]. Культивирование осуществляли в периодическом режиме в условиях принудительной аэрации (на качалке ЕІран-357, Польша) в трехкратной повторности. Биомассу бактерий оценивали по оптической плотности бактериальной суспензии при 590 нм. Наличие ИУК в бесклеточной культуральной жидкости определяли колориметрическим методом с реактивом Сальковского при 540 нм [2, 3]. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам с использованием программы Excel'2003.

Для определения сроков максимального выхода ИУК проводили предварительные эксперименты по изучению динамики синтеза ауксина в процессе периодического роста некоторых штаммов эндофитных бактерий (табл. 1). Установлено, что оптимальное время отбора культуральной жидкости бактерий-продуцентов для определения ИУК приходится на 7-е сутки – в начале фазы отмирания периодической культуры.

Результаты изучения способности чистых культур 15 штаммов эндофитных бактерий к син-

тезу ИУК в процессе периодического роста на среде Чапека с триптофаном представлены в табл. 2. Показано, что способность к синтезу ауксинов у исследованных штаммов эндофитных бактерий выражена в различной степени. По концентрации ИУК в культуральной жидкости нами выделено 5 групп микроорганизмов: очень активные продуценты (более 10 мкг/мл) – штаммы *m2*, *h*, *e5* и *r*, активные (6 – 10 мкг/мл) – *k*, *m* и *i*, слабо активные (2 – 3 мкг/мл) – *e2*, *e8*, *e1* и *u*, практически неактивные (менее 1 мкг/мл) – *b*, непродуценты – *s*, *s5* и *e3*. Таким образом, ИУК обнаружена в культуральной жидкости 12 из 15 штаммов в количестве от 0,3 до 29,0 мкг/мл, что сопоставимо с аналогичными результатами Е.А. Цавкеловой и др. [2, 3] по изучению культур бактерий р. *Bacillus*, ассоциированных с воздушными и субстратными корнями тропических орхидных, в которых концентрация ИУК составляла от 4 до 55 мкг/мл.

Общая продукция ИУК чистой культурой не всегда совпадает с удельной активностью микроорганизмов, выраженной как отношение концентрации

ИУК к единице биомассы по ОП₅₉₀. Например, бактерии штамма *e1*, являющиеся по суммарной концентрации ауксина слабо активными (2,7 мкг/мл), по удельной активности (8,2) занимают второе место после самой активной культуры – *m2*, соответствующие показатели для которой составляют – 29,0 мкг/мл и 13,1. Вместе с тем штамм *h*, обладающий высокой активностью по общей продукции ИУК (20,4 мкг/мл), имеет среднюю удельную активность – 2,5. В то же время выявлены микроорганизмы, которые демонстрируют одинаковый уровень активности по двум сравниваемым показателям. К ним относится самый активный штамм *m2* и, в частности, наименее активный штамм *b*, для которого концентрация ИУК в культуральной жидкости составляет 3,0 мкг/мл, а удельная активность – 0,1.

Наибольшее разнообразие эндофитных бактерий с высокой продукционной активностью в отношении ИУК (штаммы *m2*, *h*, *i*, *e1*, *e5*, *m*, *e2*), обнаружено в молодых подземных органах – придаточных корнях и окончаниях стеблекорневых тубероидов *D. maculata* в фазы цветения и покоя.

Таблица 1. Изменение биомассы и концентрации ИУК в процессе периодического роста чистых культур эндофитных бактерий *D. maculata*

Штамм	Время, сутки					
	5		7		9	
	Биомасса, ед. ОП ₅₉₀	ИУК, мкг/мл	Биомасса, ед. ОП ₅₉₀	ИУК, мкг/мл	Биомасса, ед. ОП ₅₉₀	ИУК, мкг/мл
<i>b</i>	4,8±0,05	0	3,0±0,10	0,3±0,21	2,4±0,04	0
<i>m</i>	8,3±0,06	5,6±0,01	2,7±0,06	7,2±0,21	2,5±0,06	6,6±0,08
<i>e5</i>	18,1±0,14	9,0±0,11	8,2±0,08	14,9±0,44	7,6±0,04	15,2±0,41
<i>s5</i>	2,6±0,04	0	1,6±0,05	0	0,8±0,01	0

Таблица 2. Показатели биомассы и продукции ИУК в чистых культурах эндофитных бактерий *D. maculata*

№ п/п	Штамм	Биомасса, ед. ОП ₅₉₀	ИУК, мкг/мл	ИУК/ОП ₅₉₀
1	<i>b</i>	3,0±0,10	0,3±0,21	0,1
2	<i>e1</i>	0,3±0,05	2,7±0,12	8,2
3	<i>e2</i>	0,7±0,05	2,9±0,23	4,4
4	<i>e3</i>	0,3±0,04	0	0
5	<i>e5</i>	8,2±0,08	14,9±0,44	1,8
6	<i>e8</i>	4,1±0,10	2,8±0,13	0,7
7	<i>h</i>	8,3±0,24	20,4±0,27	2,5
8	<i>i</i>	1,5±0,08	6,0±0,42	4,1
9	<i>k</i>	6,5±0,47	8,2±0,27	1,3
10	<i>m</i>	2,7±0,06	7,2±0,21	2,7
11	<i>m2</i>	2,2±0,05	29,0±0,51	13,1
12	<i>r</i>	2,6±0,10	11,8±0,34	4,5
13	<i>s</i>	0,7±0,06	0	0
14	<i>s5</i>	1,6±0,05	0	0
15	<i>u</i>	1,3±0,05	2,3±0,22	2,8

Наименьшее количество продуцентов ИУК отмечено в старых подземных органах *D. maculata* в фазу листообразования. Среди активных бактерий-продуцентов в этот период вегетации в придаточных корнях обнаружен штамм *m*, а в окончаниях стеблекорневых тубероидов выявлены культуры *h*, *i* и *r*. Количество и разнообразие продуцентов ИУК, по-видимому, обусловлено содержанием триптофана в подземных органах *D. maculata*, который может являться экзогенным прекурсором для бактериального синтеза ауксинов. В частно-

сти, ранее нами был установлен низкий уровень этой аминокислоты в старых тубероидах и способность к ее накоплению в молодых запасающих органах [7], что согласуется с результатами наших микробиологических исследований.

Таким образом, показано, что большинство эндофитных бактерий р. *Bacillus* могут превращать триптофан в дополнительную ИУК и, тем самым, оказывать влияние на гормональный статус *D. maculata*, регулируя рост и развитие растительного организма.

10.09.2011

Список литературы:

1. Vauman P., Otero J.T. Microbial endophytes of orchid roots // Soil Biology. – 2006. – V. 9. – P. 153–177.
2. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – № 1. – С. 55–62.
3. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Klimova S.Yu. et al. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin // Archives of Microbiology. – 2007. – V. 188. – № 6. – P. 655–664.
4. Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithamparam K. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria // Plant Soil. – 1994. – V. 159. – P. 291–295.
5. Тихонович И.А., Кожемяков А.П., Чеботарь В.К. и др. Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве). М.: Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.
6. Шеховцова Н.В., Первушина К.А., Маракаев О.А., Холмогоров С.В., Осипов Г.А. Микроорганизмы, ассоциированные с подземными органами орхидных средней полосы России // Проблемы агрохимии и экологии, 2010. – № 4. – С. 30-36
7. Маракаев О.А., Титова О.В. О возможном участии аминокислот в биосинтезе ауксинов у *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae) // Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях. Тезисы VI Международной конференции. Москва, 2000. С. 49.

Работа выполнена в рамках проведения научных исследований по темплану Минобрнауки №01.01.11 и реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», госконтракт № П271

Сведения об авторах:

Шеховцова Нина Валентиновна, заведующий кафедрой ботаники и микробиологии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова, кандидат биологических наук, доцент, e-mail: ninval@mail.ru

Маракаев Олег Анатольевич, доцент кафедры ботаники и микробиологии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова, кандидат биол. наук, доцент, e-mail: olemar@yandex.ru

Первушина Ксения Александровна, ассистент кафедры ботаники и микробиологии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова, кандидат биологических наук, e-mail: bioksusha@mail.ru

Холмогоров Сергей Владимирович, аспирант кафедры ботаники и микробиологии, факультет биологии и экологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова, e-mail: serg_kholm@mail.ru

Цапляева Ксения Германовна, студент, выполняющий научную работу на кафедре ботаники и микробиологии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова, e-mail: shivery_coddle@km.ru

150000, г. Ярославль, ул. Советская, д. 14, тел. (4852) 480739

UDC 579.017.575

Shehovtsova N.V., Marakaev O.A., Pervushina K.A., Kholmogorov S.V., Tsaplyeva K.G.

Yaroslavl state university, e-mail: bioksusha@mail.ru

AUXINE PRODUCTION BY ENDOPHYTIC BACTERIA FROM UNDERGROUND ORGANS OF *DACTYLORHIZA MACULATA* (L.) SOO (ORCHIDACEAE)

For the first time it was established, that the bacteria of the genus *Bacillus* which were isolated from the underground organs of *Dactylorhiza maculata*, the representative of family Orchidaceae inhabiting temperate climate region of Russia, have produced phytohormone 3-indolylacetic acid (IAA). The IAA level found out in cultural liquid of 12 from 15 bacterial strains was within the limits 0,3 – 29 mkg/ml and depended on strain.

Key words: orchids, additional roots, tuber, endophytes, endophytic bacteria, 3-indolylacetic acid.