

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ МЕТАБОЛІТИ ШТАМУ *PSEUDOMONAS* SP. 2303 – ІНГІБІТОРИ ФІТОПАТОГЕНІВ І СТИМУЛЯТОРИ РОСТУ РОСЛИН

**В.В. Клочко¹, К.О. Чугунова¹, Л.О. Крючкова², Т.І. Бондар³,
С.В. Федоренко³, Л.В. Авдєєва¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 13, Київ, 03041, Україна

³Інститут захисту рослин НААН України,
вул. Васильківська, 33, Київ, 03022, Україна
e-mail: vvklochko@ukr.net

Мета. Визначення біологічно активних сполук штаму *Pseudomonas* sp. 2303 та оцінка їх внеску у стимуляцію росту рослин і захист від фітопатогенів. **Методи.** Антагоністична активність, глибинне культивування, тонкошарова хроматографія, рідинна хромато-мас-спектрометрія, газова хроматографія. **Результати.** Передпосівна обробка насіння пшениці штамом *Pseudomonas* sp. 2303 забезпечувала зниження розвитку фузаріозної кореневої гнилі на 42,4 – 50,8%. Виявлено синтез штамом піролінтрину – гетероциклічної сполуки фунгіцидної дії. Показано, що *Pseudomonas* sp. 2303 синтезував гормони-стимулятори: індоліл-3-карбінол, індоліл-3-карбоксальдегід, зеатин-рибозид та ізопентил-аденозин. Біотестуванням підтверджена дія цих фітогормонів, що проявлялася у стимулюванні росту пшениці на 7 – 15%. Кількість синтезованого штамом етилену складала 16,5 нМ·год⁻¹·г⁻¹; основною екзокислотою була молочна (90% від загального пулу органічних кислот, що утворював штам). Встановлено вплив культури *Pseudomonas* sp. 2303 на нематоди – через 24 год спостерігали загибель 10 – 15% фітопаразитичних і сапробіотичних нематод. Концентрація 200 мкг/мл феназин-1-карбонової кислоти через 1 год призводила до загибелі 30%, а через 24 год – 100% нематод, при цьому нематодостатичний ефект не спостерігався. **Висновки.** За сукупністю встановлених ознак штам *Pseudomonas* sp. 2303 є типовим представником ризосферних бактерій, які стимулюють розвиток рослин. Його висока антагоністична активність по відношенню до різних груп фітопатогенних мікроорганізмів, а також синтез антибіотичних і фітогормональних сполук дають можливість розглядати штам *Pseudomonas* sp. 2303 як основу біопрепаратів проти збудників хвороб та для стимуляції росту і розвитку сільськогосподарських рослин.

Ключові слова: PGPR-бактерії, *Pseudomonas*, цитокініни, ауксини, феназин-1-карбонова кислота, піролінтрин, рістстимулювальна активність.

Поліпшення стану ґрунтів для сільського господарства вимагає оптимального і раціонального використання їх родючості та залежить від фізичного стану і біологічних процесів у ґрунтах. В цьому контексті необхідно проводити вивчення мікробного біорізноманіття, яке може виступати як показник якості ґрунту і продуктивності рослин [1]. Створення біопрепаратів на основі ризосферних бактерій роду *Pseudomonas*, що ха-

рактикуються синтезом корисних для рослин метаболітів та є активними проти збудників хвороб сільськогосподарських рослин, залишається актуальним завданням сектору сільськогосподарської біотехнології. Захист від фітопатогенів та підвищення врожайності рослин реалізується за допомогою різних комплексних підходів, включаючи хімічні засоби захисту, методи традиційної селекції та отримання трансгенних рослин. Найбільш екологічно чистим методом захисту рослин від збудників хвороб може бути використання препаратів на основі природних немодифікованих мікроорганізмів, зокрема, активних PGPR-штамів – ризосферних бактерій, які стимулюють розвиток рослин, що є альтернативою хімічним пестицидам та іншим методам захисту. Важливою умовою успішного біологічного контролю фітопатогенів та підвищення врожайності є здатність PGPR-бактерій продукувати стимулятори росту рослин (фітогормони), покращувати засвоєння фосфору рослинами, фіксувати атмосферний азот, індукувати резистентність рослин, синтезувати фактори опосередкованої стимуляції росту (антибіотики, сидерофори тощо) [2, 3].

Біологічний контроль фітопатогенів ризосферними псевдомонадами є результатом комплексної дії різних механізмів, що включають як біосинтез біологічно активних сполук, так і конкуренцію PGPR-штамів роду *Pseudomonas* та збудників хвороб рослин за джерела азотного і фосфорного живлення. Хоча багато штамів *Pseudomonas* показують хороші результати в лабораторних випробуваннях, однак не завжди підтверджується їх ефективність щодо біоконтролю в польових умовах. Прогрес в області молекулярно-генетичних технологій і публікації повних послідовностей геномів PGPR-штамів полегшили дослідження функцій, що регулюють взаємодії мікроорганізмів і рослин. На основі генотипових і фенотипових характеристик ґрунтових видів *Pseudomonas* виділяють потенційні штамми ризобактерій для комерційних розробок. Такий підхід значно покращує і спрощує розробку нових препаратів псевдомонад для біоконтролю [4].

На основі бактерій роду *Pseudomonas* розроблені і ефективно використовуються в світі такі біопрепарати, як Bioject (*P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*), Cedemon (*P. chlororaphis*), Псевдобактерін-2 (*P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*), Бінорам (*P. fluorescens*), BioSave (*P. syringae*) та Планріз (*P. fluorescens*), що пригнічують розвиток фітопатогенних грибів представників родів *Fusarium*, *Pythium*, *Mucor*, *Penicillium*; Blue-Circle (*P. cepacia* type Wisconsin) – для захисту рослин від грибних інфекцій та нематод; Blightban (*P. fluorescens*) і Frostban (*P. fluorescens*) – проти бактеріальних інфекцій, спричинених *Erwinia amylovora* [4, 5]; Гаупсин (два штамми *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*) – комплексний біопрепарат з ентомопатогенною і противірусною активністю [6].

В попередніх наших дослідженнях шляхом скринінгу серед ризосферних штамів роду *Pseudomonas* з колекції відділу антибіотиків ІМВ НАНУ було відібрано штам *Pseudomonas* sp. 2303, який характеризувався високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроорганізмів [7].

Метою даної роботи була характеристика ряду біологічних властивостей штаму *Pseudomonas* sp. 2303 як моделі PGPR-бактерій і оцінка їх внеску у стимулювання росту рослин і захисту від патогенів.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом дослідження був штам *Pseudomonas* sp. 2303 з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Культивування штаму *Pseudomonas* sp. 2303 проводили в 150 мл середовища Кінг В (пептон – 2,0%; K_2HPO_4 – 0,15%; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,15%; гліцерин – 1,0%) в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл на круговій качалці (220 об/хв) за температури $28 \pm 2^\circ C$ протягом 72 год. Для підвищення біосинтезу піролнітрину використовували рідке середовище van Pee з триптофаном (на 1 л дистильованої води): гліцерин – 30 г, $(NH_4)_2SO_4$ – 1 г, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5 г, K_2HPO_4 – 3 г, KH_2PO_4 – 0,5 г, d-триптофан – 0,61 г.

Антагоністичні властивості штаму *Pseudomonas* sp. 2303 щодо фітопатогенних грибів було досліджено на модельних системах зі штучним зараженням проростків пшениці збудниками кореневих гнилей – грибами *Fusarium graminearum* 08G та *Bipolaris sorokiniana* 10Z. Вирощування проростків пшениці та інокуляцію їх фітопатогенами проводили у стерильному субстраті (піску). Ефективність використання штаму *Pseudomonas* sp. 2303 для захисту проростків пшениці від кореневих гнилей визначали за різних способів обробки насіння та субстрату: насіння замочували у суспензії клітин *Pseudomonas* sp. 2303 (1×10^8 кл/мл), яку отримували змивом колоній з поверхні МПА, та у культуральній рідині штаму (концентрація клітин – 1×10^7 кл/мл). Культуральну рідину (1×10^7 кл/мл) вносили також у субстрат з розрахунку 1 мл/г піску через 12 днів після сівби. У контрольному варіанті насіння замочували у стерильній воді. Тривалість замочування насіння у всіх варіантах становила 2 години. У фазі 3 – 4 листків проростки пшениці викопували, обмивали від піску і проводили облік кореневих хвороб за відповідними 4-бальними шкалами згідно з описаними методиками [8].

Дослідження впливу на нематоди бактеріальної культури *Pseudomonas* sp. 2303 та феназин-1-карбонової кислоти проводили за методикою Канцельсона і Гендерсона, оптимізованою для представників роду *Pseudomonas* [9]. Як тест-об'єкти використовували нематоди, виділені в лабораторії нематології Інституту захисту рослин НААН України з ураженої дитиленхозом картоплі виду *Ditylenchus destructor*, та комплекс фітопаразитичних і сапробіотичних нематод, виділених з ґрунту. Ізоляти нематод переносили в стерильну воду і промивали 3 – 5 разів для очищення кутикули нематод. За допомогою градуйованої піпетки вносили 0,1 мл підготовленої суспензії нематод, що містила 20 особин, на поверхню чашки Петрі з попередньо вирощеною на м'ясо-пептонному агарі (МПА) культурою *Pseudomonas* sp. 2303 та у водні розчини феназин-1-карбонової кислоти різної концентрації (20, 50, 100 і 200 мкг/мл). Для вільного руху нематод поверхню середовища в чашці Петрі зволожували стерильною водою. Антинематодну дію визначали методом світлової мікроскопії за руховою активністю нематод. Контролем слугували чашки Петрі з МПА без бактеріальної культури, а при дослідженні феназин-1-карбонової кислоти – стерильна водогінна вода.

Визначення піролнітрину проводили у фугаті культуральної рідини методом хромато-мас-спектрометрії на рідинному хроматографі Agilent 1200 з використанням мас-спектрометричного детектора Agilent G1956B. Хроматографічна колонка Ascentis RP-amide C18

(150мм×4,6 мм×5 мкм), система метанол-вода з додаванням 0,1% оцтової кислоти, градієнтний режим. Мас-спектрометричний аналіз проводили в режимі селективного моніторингу (SIM), реєструючи іони з співвідношенням значення маса/заряд (m/z), яке дорівнювало 257.

Рістстимулювальну активність культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. 2303 визначали методом рулонної культури [10]. В дослідках використовували насіння озимої пшениці сорту Альбатрос одеський. Результати оцінювали за загальною фітостимулювальною активністю, підраховуючи кількість пророщеного насіння, масу наземної і кореневої частин, та виражали у відсотках відносно контролю (обробка насіння пшениці дистильованою водою).

Для визначення фітогормональних сполук культуральну рідину штаму *Pseudomonas* sp. 2303 в експоненційній фазі росту центрифугували 30 хв при 5000 г і температурі не вище 15°C. Фугат використовували для якісного та кількісного аналізу фітогормонів, яке проводили методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [10]. Здатність до синтезу екзогенних фітогормонів розраховували в мкг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Для дослідження синтезу етилену штаму *Pseudomonas* sp. 2303 культивували на середовищі МПА за температури $28\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 72 год у герметично закритих флаконах. Кількісне визначення етилену проводили на газовому хроматографі Chrom 5 з полум'яно-іонізаційним детектором (тверда фаза – β - β' -оксидпропіонітрил, газова – гелій). Концентрацію етилену розраховували за калібрувальним графіком, побудованим згідно розведень етилену, і виражали у молях за годину на 1 г АСБ продуцента.

Карбонові кислоти визначали методом газової хроматографії. Проби для аналізу готували фільтруванням культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. 2303 через мембранні фільтри діаметром 13 мм (діаметр пор 0,2 мкм). Дослідження проводили на газовому хроматографі Chrom 5 (колонка Полісорб II) з полум'яно-іонізаційним детектором. Об'єм проби – 5,0 мкл; режим – градієнтний; газ-носії – гелій; швидкість потоку – 20 мл/хв; початкова температура колонки – 120°C; кінцева температура колонки – 210°C; проміжна температура – 150°C; температурний градієнт – 4°C/хв.

Експерименти проводили в трьох повторах, результати обробляли статистично з використанням пакетів спеціальних програм Microsoft Excel'2010, вираховуючи середнє значення і стандартне відхилення. Достовірність різниці між середніми значеннями визначали за t -критерієм Ст'юдента і вважали достовірною при $p < 0,05$. В таблицях наведені середні значення.

Результати. Першим етапом досліджень була перевірка дії суспензії клітин і культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. 2303 на кореневі гнилі пшениці, викликані *B. sorokiniana* і *F. graminearum* (табл. 1).

В результаті проведених досліджень встановлено, що передпосівна обробка насіння пшениці як суспензією клітин штаму *Pseudomonas* sp. 2303, так і його культуральною рідиною може забезпечити зниження розвитку фузаріозної кореневої гнилі на 42,4 – 50,8%. Максимальну ефективність отримано при внесенні культуральної рідини у субстрат (79,0%), що свід-

чить про високу захисну активність метаболітів даного штаму. Проте в умовах вегетаційного дослідю не підтвердилася раніше встановлена активність даного штаму щодо іншого фітопатогена – гриба *B. sorokiniana* [7]. Ні обробка насіння пшениці суспензією клітин, ні культуральною рідиною, ні внесення його метаболітів разом з культуральною рідиною у субстрат не призводили до зниження розвитку гельмінтоспориозної кореневої гнилі. Очевидно, це можна пояснити тим, що збудник даної хвороби гриб *B. sorokiniana* характеризується меншою чутливістю до метаболітів *Pseudomonas* sp. 2303, ніж представники роду *Fusarium*.

Таблиця 1

Вплив *Pseudomonas* sp. 2303 на розвиток корневих гнилей пшениці за різних способів обробки

№	Варіант дослідю	Спосіб обробки	Розвиток хвороби			
			Фузаріозна коренева гниль		Гельмінтоспориозна коренева гниль	
			бал (0-4)	% до контролю	бал (0-4)	% до контролю
1	Суспензія клітин, 10 ⁸ кл/мл	Замочування насіння	1,17	49,2	1,13	105,6
2	Культуральна рідина, 10 ⁸ кл/мл	Замочування насіння	1,37	57,6	1,08	100,1
3	Культуральна рідина, 10 ⁸ кл/мл	Внесення в пісок	0,5	21,0	1,3	121,5
4	Вода (контроль)	Замочування насіння	2,38		1,07	

Відомо, що нематоди ризосфери здатні уражувати рослини та викликати зниження їх урожайності. При дослідженні впливу культури *Pseudomonas* sp. 2303 на комплекс фітопаразитичних і сапробіотичних нематод, в тому числі і виду *Ditylenchus destructor*, встановлено, що штам проявляв виражену антагоністичну активність, викликаючи відштовхування нематод від газону бактерій в усіх варіантах. Культури нематод характеризувалися уповільненими конвульсивними рухами. При цьому через 24 год спостерігали загибель 10 – 15% як фітопаразитичних, так і сапробіотичних нематод (у контролі нематоди вільно рухалися по поверхні МПА і досягали країв чашки Петрі). Концентрація феназин-1-карбонової кислоти у 100 мкг/мл вже через 1 год викликала загибель 25%, а через 24 год – 90% нематод. При концентрації у 200 мкг/мл через 1 год спостерігалася пригнічення руху 60% і загибель 30% нематод, а через 24 год відбувалася їх повна загибель. Нематодостатичний ефект (відновлення рухливості нематод після 24 год) в жодному варіанті дослідю не спостерігався.

Відомо, що представникам псевдомонад притаманна здатність синтезувати антибіотично активні сполуки (феназин-1-карбонову кислоту, піолотеорин, піролнітрин, 2,4-діацетилфлороглюцин), які характеризуються можливістю пригнічувати фітопатогенні мікроорганізми, в тому числі гриби [11]. Метою наших подальших досліджень було встановлення тих метаболітів штаму *Pseudomonas* sp. 2303, що проявляють фунгіцидну дію і стимулюють розвиток рослин.

Оскільки в наших дослідках штам *Pseudomonas* sp. 2303 характеризувався антифунгальними властивостями, була перевірена його здатність щодо синтезу фунгіцидного антибіотика піролнітрину. Для цього штам *Pseudomonas* sp. 2303 вирощували на середовищі з d-триптофаном – попередником біосинтезу піролнітрину [12]. За даними проведеного LC/MS-аналізу (рис. 1) було виявлено сполуку з максимумом поглинання 249 і молекулярною масою 257, значення яких відповідали піролнітрину.

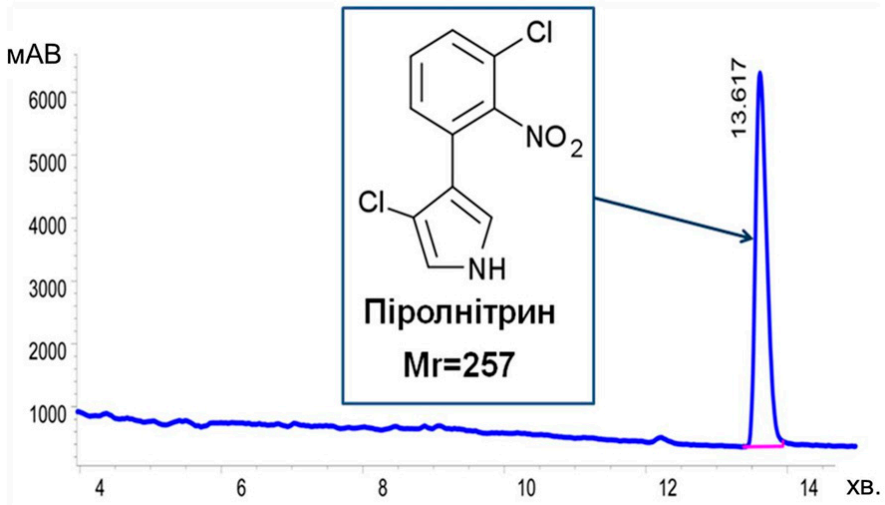


Рис. 1 LC/MS-аналіз культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. 2303, вирощеного на середовищі van Pee з d-триптофаном

Зазначимо, що піролнітрин синтезувався тільки на середовищі з d-триптофаном, його концентрація була незначною і становила не більше 2 мг/мл.

Наступним етапом досліджень була перевірка у модельній системі стимулювальної дії культуральної рідини *Pseudomonas* sp. 2303 на ріст пшениці (рис. 2).

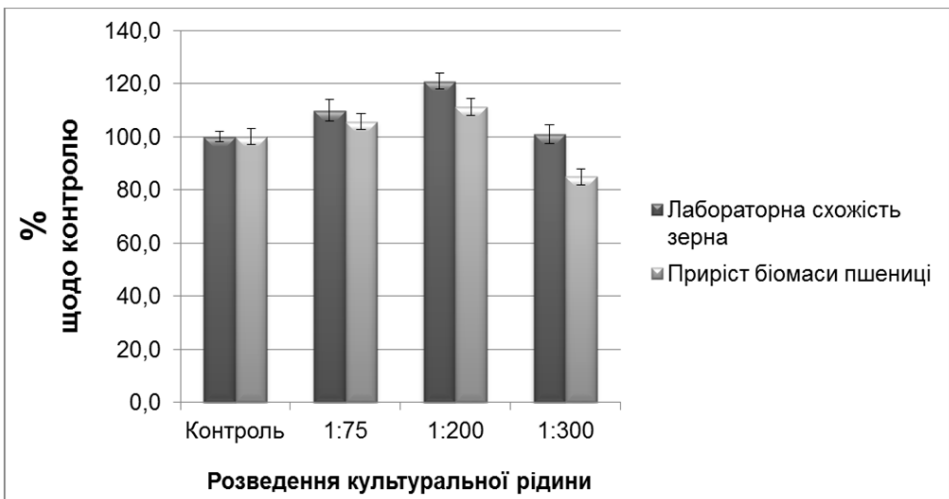


Рис. 2. Вплив культуральної рідини *Pseudomonas* sp. 2303 на ріст пшениці (контроль – обробка пшениці дистильованою водою)

Як видно з рис. 2, культуральна рідина штаму проявляла стимулювальний ефект, який залежав від ступеню її розведення і був найбільшим при розведенні 1:200. Нерозведена культуральна рідина стимулювальною активністю не відзначалася. При розведенні 1:75 і 1:300 фітостимулювальна активність дещо зменшувалася, що можна пояснити зміною співвідношення гормональних і негормональних сполук і, як наслідок, зміною їх кооперативного впливу на дослідні рослини [10].

Було визначено, що даний штам синтезував сполуки фітогормональної дії, що відносилися до класів ауксинів і цитокінінів (табл. 2).

Таблиця 2

Біосинтез штамом *Pseudomonas* sp. 2303 ауксинів і цитокінінів

Фітогормони		Рівень синтезу фітогормонів, мкг/г АСБ
Ауксини	індоліл-3-карбінол	837,39
	індоліл-3-карбоксальдегід	341,79
	Σ ауксини	1179,18
Цитокініни	зеатин-рибозид	17,0
	ізопентил-аденозин	133,90
	Σ цитокініни	150,9

У ризосферних псевдомонад найбільш вивчена здатність до синтезу індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), яка стимулює розвиток кореневої системи рослин. Однак більшість PGPR-штамів псевдомонад продукують ІОК в незначних кількостях [13, 14]. Слід зазначити, що штам *Pseudomonas* sp. 2303 не синтезував фізіологічно активної ІОК, що може бути зумовлено особливостями біології цього ризосферного штаму. Встановлено синтез рибозильованого зеатину на рівні 17,0 мкг/г АСБ, який відіграє важливу роль у формуванні адаптивних взаємовідносин між мікроорганізмом та рослиною-хазяїном [10].

Оскільки *Pseudomonas* sp. 2303 синтезував фітогормони класу ауксинів, нами була проведена оцінка їх біологічної ефективності у модельній системі – пшениці сорту Альбатрос одеський. Дані біотесту на ауксини представлені на рис. 3.

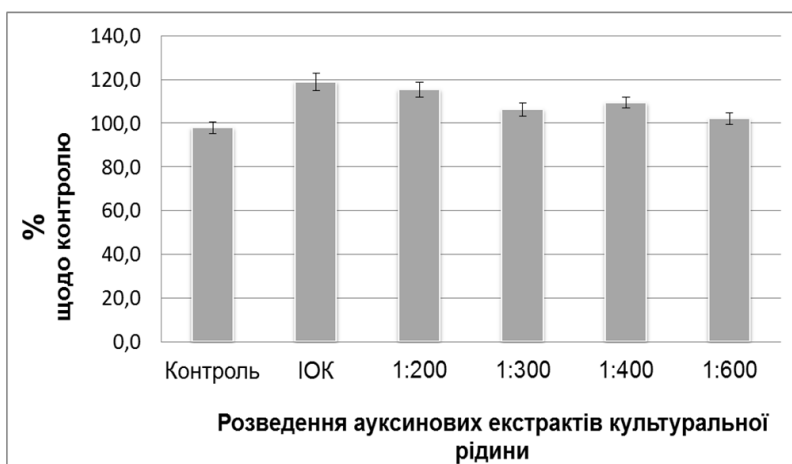


Рис. 3. Вплив ауксинів штаму *Pseudomonas* sp. 2303 на ріст колеоптилів пшениці (контроль – дистильована вода, стандарт ІОК – конц. 10^{-5} М)

Результати дослідів підтвердили при всіх обраних розведеннях культуральної рідини стимулювальну дію ауксинів, які синтезувались штамом *Pseudomonas* sp. 2303, перевищуючи контрольні значення в середньому на 7 – 15%. Найбільший стимулювальний ефект спостерігався при розведенні екстракту в 200 разів.

Також отримані нами дані (рис. 4) підтверджують здатність штаму *Pseudomonas* sp. 2303 синтезувати як етилен, так і карбонові кислоти.

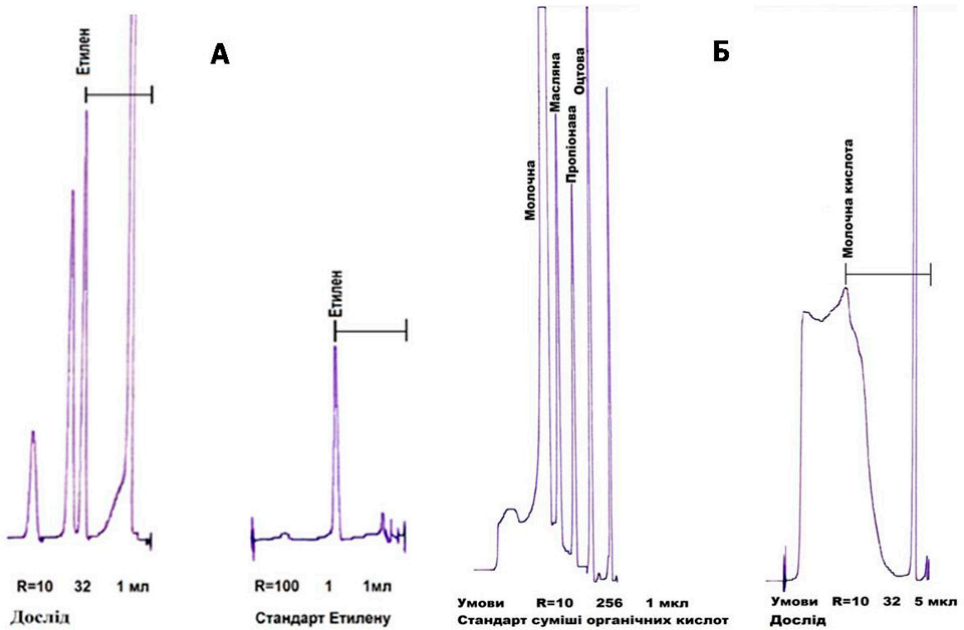


Рис. 4. Синтез етилену (А) і карбонових кислот (Б) штамом *Pseudomonas* sp. 2303

Кількість синтезованого етилену дослідженим штамом складала $16,5 \text{ нМ} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ і відповідала (серед представників роду *Pseudomonas*) значенням дещо вищим за середні. За результатами вивчення органічних кислот в культуральній рідині штаму *Pseudomonas* sp. 2303 визначено, що основною кислотою була молочна, вміст якої складав не менше 90% від загальної кількості органічних кислот; пул інших карбонових кислот сумарно не перевищував 10%.

Обговорення. Отримані дані щодо впливу *Pseudomonas* sp. 2303 на розвиток корневих хвороб корелюють з результатами інших дослідників. Відомо, що деякі види псевдомонад здатні колонізувати коріння рослин, захищаючи їх від різних патогенних мікроорганізмів шляхом індукції процесів системної стійкості (ISR – Induced Systemic Resistance). Наприклад, штам *P. fluorescens* WCS417 індукував такі процеси при обробці насіння редьки і гвоздики, при цьому ураження рослин видами *F. oxysporum* і *F. cucumerinum* знижувалося на 42%, а загальне збільшення врожаю зросло на 45%. Wei із співавторами показали, що штам *P. putida* 89B-27 індукував стійкість листків огірка до антракнозу, викликаному *Colletotrichum orbiculare*, та в'янення, зумовленого видами *Fusarium*. При обробці ґрунту штамом *P. fluorescens* CHA0 значно зменшувалася концентрація клітин

Thielaviopsis basicola – фітопатогенного гриба, збудника чорної кореневої гнилі. Штам *P. fluorescens* Pf-5, ізолюваний з ризосфери бавовника, пригнічував розвиток *Globisporangium ultimum* і *Rhizoctonia solani* [15].

При вивченні ефективності використання бактерій роду *Pseudomonas* у сільському господарстві увага дослідників часто приділена їх застосуванню у боротьбі з галовою нематодою томатів та інших культур роду *Meloidogyne*. Однак не менш шкідливими є фітогельмінти картоплі родів *Globodera* та *Ditylenchus*, які розповсюджені майже в усіх країнах. Особливість нематод виду *D. destructor* в тому, що вони не тільки уражують рослини в період вегетації, а ще й викликають загибель бульб картоплі під час їх зберігання [16, 17]. Зазначається, що ризосферні мікроорганізми можуть пригнічувати фітонематоди як за рахунок синтезу специфічних метаболітів, так і за рахунок індукованої стійкості рослин після їх обробки ризобактеріями [18].

PGPR-псевдомонади шляхом біосинтезу специфічних речовин в присутності фітопатогенів можуть викликати захисну реакцію у рослин, а утворення видами *Pseudomonas* таких сполук, як сідерофори, позаклітинні літичні ферменти, антибіотики є основним механізмом біоконтролю [19]. Одним з пояснень антагоністичного ефекту щодо фітопатогенних грибів і нематод є синтез феназин-1-карбонової кислоти видами *Pseudomonas* [17, 18]. Раніше нашими дослідженнями було встановлено, що штам *Pseudomonas* sp. 2303 містить ген *phzD* феназинового оперону та синтезує антибіотичну сполуку – феназин-1-карбонову кислоту у значній кількості [7]. В даній роботі показано синтез штамом ще однієї сполуки фунгіцидної дії – піролнітрину.

Також встановлена здатність штаму *Pseudomonas* sp. 2303 до біосинтезу етилену та карбонових кислот. Відомо, що органічні екзокислоти PGPR-бактерій відіграють позитивну роль, в тому числі й приймають участь в мобілізації фосфору у ґрунтах. Синтезовані бактеріями карбонові кислоти зазвичай представлені спектром, що включає молочну, оцтову, пропіонову, масляну кислоти. Ці сполуки виступають джерелом поживних речовин для рослин, забезпечують кращу колонізацію коренів рослин. Утворення етилену ризосферними штамми є опосередкованою ознакою синтезу фітогормональних сполук і чинить вплив на асоціативні зв'язки між рослиною та мікроорганізмами [13, 20]. Згідно даних літератури, етилен виступає як фітогормон-інгібітор, проте може розглядатися і як гормон стресу, його проникнення в рослину при взаємодії з асоціативними бактеріями може впливати на підвищення стійкості рослини до абіотичних чинників [21].

Отже, нами були охарактеризовані основні біологічні сполуки, утворювані штамом *Pseudomonas* sp. 2303, що здатні проявляти як захисну, так і фітостимулюючу дію. Встановлено, що передпосівна обробка насіння пшениці штамом *Pseudomonas* sp. 2303 забезпечувала зниження розвитку фузаріозної кореневої гнилі на 42,4 – 50,8%. Досліджено, що крім синтезу феназин-1-карбонової кислоти *Pseudomonas* sp. 2303 утворює сполуку фунгіцидної дії – піролнітрин. Показано біосинтез штамом гормонів-стимуляторів, що відносяться до класів ауксинів та цитокінінів: індоліл-3-карбінолу, індоліл-3-карбоксальдегіду, зеатин-рибозиду, ізопентил-аденозину. В модельній системі підтверджена дія цих фітогормонів,

що проявлялася у стимуляції росту пшениці на 7 – 15%. Встановлено вплив культури *Pseudomonas* sp. 2303 на нематоди – штам проявляв виражену антагоністичну активність. Концентрація 100 мкг/мл феназин-1-карбонової кислоти через 1 год викликала загибель 25%, а через 24 год – 90% нематод (концентрація у 200 мкг/мл через 24 години викликала загибель 100% нематод). При цьому нематодостатичний ефект не спостерігався.

За сукупністю встановлених ознак штам *Pseudomonas* sp. 2303 можна віднести до типового представника PGPR-бактерій. Його висока антагоністична активність по відношенню до різних груп фітопатогенних мікроорганізмів, а також наявність синтезу антибіотичних і фітогормональних сполук дає можливість розглядати штам *Pseudomonas* sp. 2303 як основу біопрепаратів проти збудників хвороб і стимуляції росту і розвитку сільськогосподарських рослин.

Автори висловлюють щире подяку провідному науковому співробітнику відділу антибіотиків ІМВ НАНУ І.В. Драгозову і старшому науковому співробітнику відділу загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ Н.О. Леоновій за допомогу у визначенні фітогормональних сполук.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ШТАММА *PSEUDOMONAS* SP. 2303 – ИНГИБИТОРЫ ФИТОПАТОГЕНОВ И СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

**В.В. Клочко¹, Е.О. Чугунова¹, Л.А. Крючкова², Т.И. Бондарь³,
С.В. Федоренко³, Л.В. Авдеева¹**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборонь, 13, Киев, 03041, Украина

³Институт защиты растений НААН Украины,
ул. Васильковская, 33, Киев, 03022, Украина

Резюме

Цель. Определение биологически активных веществ штамма *Pseudomonas* sp. 2303 и оценка их вклада в стимуляцию роста растений и защиту от фитопатогенов. **Методы.** Антагонистическая активность, глубинное культивирование, тонкослойная хроматография, жидкостная хромато-масс-спектрометрия, газовая хроматография. **Результаты.** Предпосевная обработка семян пшеницы штаммом *Pseudomonas* sp. 2303 обеспечивала снижение развития фузариозной корневой гнили на 42,4 – 50,8%. Установлен синтез штаммом пирролнитрина – гетероциклического вещества фунгицидного действия. Показано, что *Pseudomonas* sp. 2303 синтезировал гормоны-стимуляторы: индолил-3-карбинол, индолил-3-карбоксальдегид, зеатин-рибозид и изопентил-аденозин. Биотестами подтверждено действие этих фитогормонов, которое проявлялось в стимуляции роста пшеницы на 7 – 15%. Количество синтезированного штаммом этилена составляло 16,5 нМ·ч⁻¹·г⁻¹; основной экзокислотой была молочная (90% от общего пула органических кислот, которые образовывал штамм). Установлено влияние культуры *Pseudomonas* sp. 2303 на нематоды – через 24 ч наблюдалась гибель 10 – 15% фитопаразитических и сапробиотических нематод. Концентрация 200 мкг/мл феназин-1-карбонової кислоти через 1 ч вызывала

гибель 30%, а через 24 ч – 100% нематод, при этом нематодостатический эффект не наблюдался. **Выводы.** По сумме установленных свойств штамм *Pseudomonas* sp. 2303 является типичным представителем ризосферных бактерий, которые стимулируют развитие растений. Его высокая антагонистическая активность по отношению к различным группам фитопатогенных микроорганизмов, а также синтез антибиотических и фитогормональных соединений дают возможность рассматривать штамм *Pseudomonas* sp. 2303 как основу биопрепаратов против возбудителей болезней и для стимуляции роста и развития сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: PGPR-бактерии, *Pseudomonas*, цитокинины, ауксины, феназин-1-карбоновая кислота, пирролнитрин, ростстимулирующая активность.

BIOLOGICALLY ACTIVE METABOLITES OF PSEUDOMONAS SP. 2303 - INHIBITORS OF PHYTOPATHOGENS AND STIMULATORS OF PLANTS GROWTH

V.V. Klochko¹, K.O. Chugunova¹, L.O. Kriuchkova², T.I. Bondar³,
S.V. Fedorenko³, L.V. Avdeeva¹

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

² National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
13 Heroyiv Oborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine

³ Institute of Plant Protection, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
33 Vasylkivska str., Kyiv, 03022, Ukraine

Summary

Purpose. Determination of biologically active compounds of the strain *Pseudomonas* sp. 2303 and assessment of their impact on the plants growth and protection against phytopathogens. **Methods.** Antagonistic activity, submerged cultivation, thin-layer chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry, gas chromatography. **Results.** Treatment of wheat seeds with the *Pseudomonas* sp. 2303 provided a reduction of fusariosis root rot development by 42,4 – 50,8%. The synthesis of pyrrolnitrin, a heterocyclic compound with fungicidal activity, was revealed. It was shown that *Pseudomonas* sp. 2303 synthesized phytohormones-stimulants such as auxins and cytokinins. The effectiveness of these phytohormones was confirmed with specific biotests, in which a stimulation of the wheat growth by 7 - 15% was observed. The amount of synthesized ethylene was 16.5 nM/h/g. The main exoacid was lactic acid, whose portion was 90% of the total pool of organic acids formed by the strain. It was shown the nematocidal activity of *Pseudomonas* sp. 2303 that was able to cause a death of 10-15% of phytoparasites and saprobiotic nematodes by 24 h. Phenazine-1-carboxylic acid at 200 µg/ml led to the death of 30% and 100% of nematodes after 1 h and 24 h, correspondingly, while no nemastatic activity was observed. **Conclusion.** According to the set of established peculiarities the strain *Pseudomonas* sp. 2303 is a typical representative of rhizospheric bacteria that stimulate the plants growth. High antagonistic activity against various groups of phytopathogenic microorganisms, as well as the synthesis of antibiotics and phytohormonal compounds, let to consider the strain *Pseudomonas* sp. 2303 as a basis for the creation of biological preparations against pathogens and for stimulation of the growth and development of agricultural plants.

Keywords: PGPR-bacteria, *Pseudomonas*, auxins, cytokinins, phenazine-1-carboxylic acid, pyrrolnitrin, growth-stimulating activity.

1. Choudhary D, Sharma K, Gaur R. Biotechnological perspectives of microbes in agroecosystems. *Biotechnol. Lett.* 2011; 33:1905–10.
2. Maheshwari D, Saraf M, Aeron A, editors. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013.
3. Singh A, Parmar N, Kuhad R, editors. *Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
4. Mark G, Morrissey J, Higgins P, O’Gara F. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006; 56:167–77.
5. Walsh U, Morrissey J, Gara F. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001; 12 (3):289–95.
6. Balko OI, Kiprianova EA, Kovalenko AG, Shepelevych VV, Avdeeva LV. [Antiphytoviral activity of gaupsin biopreparat]. *Microbiol. and Biotechnology.* 2010; 2:51 – 57. Ukrainian.
7. Klochko VV, Zelena LB, Chugunova KO, Tsarenko PM, Kriuchkova LO, Pasichnyk LA, Avdeeva LV, Pidgorsky VS. [*Pseudomonas* sp. strain 2303 as active phytopathogenic antagonist and its antibiotic characteristics]. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2014; 10:161 – 166. Ukrainian.
8. Kriuchkova LO. *Korenevi i prykorenevi hvoroby pshenytsi.* Kyiv: NULES of Ukraine; 2016.
9. Korniyushenko ON, Kiprianova EA. [Effect of bacteria from the genera *Pseudomonas* and *Bacillus* on some phytohelminths]. *Microbiol Z.* 1972; 34(5):589 – 95. Russian.
10. Grabova GYu, Dragovoz IV, Leonova NO, Ostapchuk AM, Avdeeva LV. [Exometabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7524 strain with growth-stimulating activity]. *Microbiol Z.* 2017; 79(2):67–77. Ukrainian.
11. Khabbaz S, Zhang L, Caceres L, Sumarah M, Wang A, Abbasi P. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. *Ann. Appl. Biol.* 2015; 166(3):456 – 471.
12. Van Pee K, Salcher O, Fischer P, Bokel M, Lingens F. The biosynthesis of brominated pyrrolnitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Antibiot.* 1983; 36(12):1735 – 42.
13. Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2006; 42(2):117–126.
14. Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Experiment. Botany.* 2001; 52(1):487-511.
15. Weller D. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 Years. *Phytopathology.* 2007; 97(2):250–256.
16. Hasky K, Sikora R. Induced resistance – a mechanism induced systemically throughout the root system by rhizosphere bacteria towards the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Nematologica.* 1995; 41(1-5):277–356.
17. Lee J, Ma K, Ko S, Kang B, Kim I, Kim Y. Nematicidal activity of a nonpathogenic biocontrol bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Curr. Microbiol.* 2011; 62(3):746–51.

18. Vagelas I, Pembroke B, Gowen S. The control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) by *Pseudomonas oryzae* and its immunological detection on tomato roots. *Nematology*. 2007; 9(3):363–370.
19. Botelho G, Mendonca-Hagler L. Fluorescent *Pseudomonas* and rhizosphere of crops. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; 37:401–416.
20. Boronin AM. [Plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas*]. *Soros. observ. journal*. 1998; 10:25–31. Russian.
21. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2009; 84:11–18.

Отримано 13.07.2017