

ИЗУЧЕНИЕ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* В ОТНОШЕНИИ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Заинчковская А.Н., Храмцова Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск,
annazainchkovskaya@mail.ru

Фитогормон этилен является важным регулятором роста и развития растений. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды, в растительных клетках образуется избыток этого фитогормона («стрессовый этилен»), который подавляет развитие корней, стеблей, образование и рост листьев [4]. Уменьшение уровня «стрессового» этилена могут осуществлять некоторые ризобактерии, продуцирующие 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминазу (АЦК-деаминазу). Этот фермент, кодируемый *acdS* геном, отвечает за дезаминирование предшественника этилена, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК), в аммиак и альфа-кетобутират, которые бактерии используют в качестве источников азота и углерода [2,3]. Снижая АЦК растений и, следовательно, уровень этилена, бактерии, продуцирующие АЦК-деаминазу, уменьшают его ингибирующую роль.

Бактерии *Pseudomonas fluorescens* – ризобактерии, относящиеся к PGPR-группе (бактерии, стимулирующие рост растений), являются непатогенными организмами, которые обитают в почве, воде и на поверхности растений, обладают высоким уровнем активности АЦК-деаминазы [1]. Одним из важнейших механизмов, который используется бактериями *P. fluorescens* для стимуляции роста растений, является продукция ими фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (4-8 мкг/мл). Повышение концентрации ИУК способствует уменьшению уровня «стрессового» этилена. В связи с этим, одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание, с помощью генетических и генно-инженерных подходов, высокоактивных штаммов ризосферных бактерий, способных к сверхсинтезу ИУК и АЦК-деаминазы, и разработка приемов их использования для стимуляции роста сельскохозяйственных растений.

Триптофан является основным предшественником в пути биосинтеза ИУК. В связи с этим, одним из путей повышения выхода ИУК является использование мутантов, устойчивых к аналогам триптофана.

На первом этапе работы был проведен подбор оптимальной концентрации N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин и условий проведения химического мутагенеза бактерии *P. fluorescens*. Было установлено, что оптимальная доза мутагена составляла 100 мкг/мл и время обработки культуры мутагеном составляет 30 мин. Обработанные мутагеном клетки высевали на среду, содержащую аналог триптофана.

В первом эксперименте в качестве аналога был использован NL-ацетил-DL-триптофан. Показано, что все выделенные регуляторные мутанты *P. fluorescens* продуцируют ИУК (30-35мкг/мл), что в 6 раз, чем клетки дикого типа.

После проведения повторного мутагенеза с использованием другого аналога триптофана (5-метил-триптофан) были получены мутанты бактерий *P. fluorescens*, синтезирующие ИУК в 1.5-1.7 раза больше чем штаммы, полученные ранее (табл. 1).

Таблица 1 – Количество ИУК, синтезируемое мутантами

Штаммы	ИУК, мкг/мл
1	66±1,5
2	65±0,5
3	75±1,6

Таким образом, в ходе мутагенеза были получены аналогрезистентные штаммы бактерий *P. fluorescens*, синтезирующие ИУК в 10 раз выше чем бактерии дикого типа.

На следующем этапе работы были изучены ростостимулирующие свойства полученных ранее штаммов, способных к сверхсинтезу ИУК, в отношении растений огурца сорта «Зайка».

Семена огурца помещали в стерильные чашки Петри (10 штук на чашку) на фильтры и заливали 7 мл стерильной дистиллированной воды. Чашки выдерживали в течение суток при комнатной температуре для набухания семян. Затем чашки с семенами были разделены на 3 части. Одна часть была обработана 10 мл бактериальной суспензии *P. fluorescens*, несущей ген *acdS*, который кодирует АЦК-деаминазу, другая часть - 10 мл бактериальной суспензии *P. fluorescens* дикого типа, третья часть - 10 мл дистиллированной воды. Концентрация исследуемых бактерий в суспензии составляла 10^7 кл/мл. Чашки Петри с обработанными семенами выдерживали при комнатной температуре. Результаты учитывали через пять суток. Определяли массу и длину проростков, а также длину корней.

Как видно из полученных данных (табл. 2, рис. 1), наибольшую длину имеют проростки растений, семена которых обрабатывались суспензией бактерий *P. fluorescens*, обладающих способностью к сверхсинтезу ИУК (О), Эти значения в 2,4 раза превышают длину контрольных проростков, обработанных водой (К1), и в 1,2 раза – контрольных проростков, обработанных суспензией бактерий *P. fluorescens* дикого типа (К2). Наибольшие показатели длины корней также наблюдаются у проростков опытных образцов. Они в 11,7 раз больше чем К1, и в 1,2 раза – К2. По биомассе, проростки опытных образцов превосходят в 2,05 раза показатели в К1и, в 1,04 – К2.



К1 – растения, обработанные дистиллированной водой, К2 – растения, обработанные суспензией бактерий *P. fluorescens* (дикий тип), О – растения, обработанные суспензией бактерий *Pseudomonas fluorescens* (мутантные)

Рисунок 1 – Изучение ростостимулирующей активности штамма *P. fluorescens* в отношении растений огурца

Таблица 2 – Изучение ростостимулирующей активности штамма *Pseudomonas fluorescens* в отношении растений огурцов in vitro

Вариант	Длина проростка (см)	Длина корня(см)	Масса растения (г)
К1	$4,25 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,75$	$0,15 \pm 0,02$
К2	$8,7 \pm 2,2$	$6,5 \pm 0,75$	$0,296 \pm 0,08$
О	$10,4 \pm 0,9$	$7,8 \pm 0,6$	$0,308 \pm 0,06$

К1 – растения, обработанные дистиллированной водой, К2 – растения, обработанные суспензией бактерий *P. fluorescens* (дикий тип), О – растения, обработанные суспензией бактерий *Pseudomonas fluorescens* (мутантные)

Литература

1. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 10. С. 25–31.
2. ACC deaminase plays a major role in *Pseudomonas fluorescens* YsS6 ability to promote the nodulation of Alpha- and Betaproteobacteria rhizobial strains / F. X. Nascimento [et al.] // Archives of Microbiology. 2019. P. 1-2.
3. Glick, B.R. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria / B.R. Glick, D.M. Penrose, J. Li // J. Theor. Biol. 1998. V.190. P. 63-68.
4. Ma, W. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants / W. Ma, F.C. Guinel, B.R. Glick // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V.69. N.8. P. 4396-4402.