

ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ФИТОГОРМОНОВ НА РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ *LEPIDIUM SATIVUM*

Стрелецкий Р.А.¹, Качалкин А.В.¹, Федотов Г.Н.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, e-mail: streletskiyrostislav@mail.ru

Был проведен анализ культуральной жидкости дрожжей на присутствие ауксина (3-индолилуксусной кислоты или ИУК), цитокинина (зеатина) и гиббереллина (ГАЗ) при помощи ВЭЖХ-МС/МС и было показано, что дрожжи в разной степени способны к синтезу этих гормонов. Мы отобрали 6 штаммов с разным уровнем фитогормональной активности и провели эксперимент по влиянию их культуральной жидкости на рост проростков *Lepidium sativum* (кресс-салата). Оказалось, что культуральная жидкость дрожжей вызывает различные эффекты: удлинение корня, удлинение стебля и увеличение общей массы проростка, причем эти эффекты связаны с присутствием тех или иных гормонов, в частности ИУК стимулирует удлинение корня, зеатин и ГАЗ - удлинение стебля, также ГАЗ увеличивает общую массу проростка. Штаммы, обладающие способностью к синтезу всех трех гормонов, одновременно оказывали все эти эффекты.

Ключевые слова: фитогормоны, дрожжи, ауксин, зеатин, гиббереллин.

INFLUENCE OF YEAST - PLANT HORMONES PRODUCERS ON THE *LEPIDIUM SATIVUM* SEEDLINGS DEVELOPMENT

Streletskiy R.A.¹, Kachalkin A.V.¹, Fedotov G.N.¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: streletskiyrostislav@mail.ru

Yeast culture liquid analysis was conducted for the presence of auxin (3-indoleacetic acid or IAA), cytokinin (zeatin), gibberellin (GA₃) by HPLC-MS/MS and it was shown that yeasts were capable to varying degrees to the synthesis of these hormones. We selected 6 strains with different levels of hormonal activity. The experiment was performed on the effect of the culture liquid in the seedling growth of *Lepidium sativum* (watercress salad). It was found that the culture of yeast liquid caused various effects - elongation root, elongation of the stem and increased total weight of the germ, and these effects were associated with the presence of certain hormones, in particular, IAA encouraged root elongation, zeatin and GA₃ elongation of the stem, also GA₃ increased overall mass seedling. The strains having the ability to synthesize all three hormones lump all these effects are influenced.

Keywords: plant hormones, yeast, auxin, zeatin, gibberellins.

Фитогормоны – вещества, контролирующие рост и развитие растений. Среди гормонов-стимуляторов роста выделяют три основные группы: ауксины, цитокинины и гиббереллины [1].

Ауксины – гормоны апекса побега и сигнализируют о его росте в сторону корневой системы, стимулируя ризогенез. Цитокинины, наоборот, синтезируются в апексе корня и свидетельствуют о его активном росте в сторону надземной части. Баланс ауксинов и цитокининов контролирует процессы деления клеток. Для влияния гиббереллинов характерно удлинение стебля и стимуляция прорастания семян [5].

Известно, что бактерии, мицелиальные грибы, а также водоросли - активные производители растительных гормонов. Фитогормональная активность некоторых связана с патогенностью [14], но тем не менее очень многие непатогенные микроорганизмы - эпифиты и педобионты - также активно синтезируют растительные гормоны. Большое количество

исследований показывает, что такие микроорганизмы влияют на рост и развитие высших сосудистых растений, причем наблюдаются разнообразные эффекты – усиление ризогенеза, удлинение стебля и корня [9; 13]. Это указывает на вероятную особую роль фитогормональной активности в установлении коэволюционных связей между растениями и микроорганизмами в фитоценозах [7].

В отличие от бактерий и мицелиальных грибов экосистемная роль дрожжей мало изучена с точки зрения фитогормональной активности, но при этом представляет большой интерес, так как дрожжи являются типичными обитателями филлосферы и ризосферы, где их численность может достигать 10^7 КОЕ/г [2].

Только в последние годы появились данные, что дрожжи являются активными производителями 3-индолилуксусной кислоты (ауксина), не уступая по интенсивности синтеза мицелиальным грибам [10]. Было показано, что способность к синтезу ауксина среди дрожжей широко распространена – до 92% исследованных штаммов оказались активными [6]. Имеются также данные о стимулирующем влиянии ауксин-производящих дрожжей на рост инокулированных растений [12]. Что касается способности дрожжей к синтезу других фитогормонов, то об этом нет практически никакой информации.

Цель исследования: провести скрининг штаммов дрожжей на присутствие фитогормонов-стимуляторов в культуральной жидкости при помощи ВЭЖХ-МС/МС и изучить их влияние на рост проростков кресс-салата.

Объекты и методы

Мы провели исследование значительной (более 100 штаммов) выборки дрожжей на присутствие фитогормонов в культуральной жидкости. Идентификация штаммов проводилась на основании данных о нуклеотидной последовательности D1/D2 доменов рДНК по описанным ранее методикам [3]. Выделение штаммов проводилось в 2009-2015 годах, хранение штаммов осуществлялось в 15%-ном растворе глицерина при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для получения культуральной жидкости штаммы дрожжей в виде первоначального инокулята размером в 2 захвата петли инкубировали в микробиологических матрасах Greiner 200 на шейкере в течение 10 дней в термостате при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Среду для наработки культуральной жидкости приготавливали из расчёта 6,7 г азотной основы (Fluka) и 5 г глюкозы на один литр воды. После снятия с шейкера культуральную жидкость переносили во флаконы объемом 50 мл, центрифугировали в течение 10 мин при 11500 G и отбирали супернатант.

Для мониторинга мы выбрали самые распространенные в природе соединения из каждой группы растительных гормонов-стимуляторов роста: из ауксинов – 3-

индолилуксусную кислоту (ИУК); из цитокининов – зеатин; из гиббереллинов – гиббереллиновую кислоту (ГАЗ).

Для экстракции ИУК и ГАЗ культуральную жидкость подкисляли до pH=3 муравьиной кислотой и наносили на концентрирующий патрон С-18 500 мг фирмы Cromabond (США), пропуская со скоростью 1 капля/сек [11]. Патрон предварительно подготавливали последовательным пропуском 5 мл воды и 5 мл этанола. Прошедшую через патрон культуральную жидкость отбрасывали, а гормоны смывали 5 мл смеси этанол–вода–муравьиная кислота (80:20:0,5% v/v) в отгонную колбу. Концентрирование осуществляли на роторном испарителе при 30 °С и 50 оборотах в минуту, испаряя содержимое колбы до тех пор, пока на дне не оставалась одна капля воды (<0,5 мл). Остаток после испарения переносили в хроматографическую виалу объемом 1,5 мл, а в колбу добавляли 0,5 мл ацетонитрила и помещали в ультразвуковую ванну на 1 мин для отделения ИУК и ГАЗ от стенок колбы. Ацетонитрил из колбы переносили в виалу, после чего снова добавляли в колбу 0,5 мл ацетонитрила и повторяли обработку. Если это было необходимо, то доводили содержимое виалы ацетонитрилом до 1,5 мл.

Количественное определение ИУК проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 series с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS Agilent Technologies). Источник ионизации – электроспрей (-), напряжение на входном капилляре – +2500V, напряжение на ячейке соударения 15V. Ионы - прекурсоры: ауксин - $m/z=174,06$; ГАЗ – $m/z=345,14$. Колонка ВЭЖХ RP-8 3.5 мкм 4,6x200 мм. Скорость потока элюента 0.5 мл/мин. Подвижная фаза – муравьиная кислота 10 мМ и ацетонитрил (60:40 v/v). Объем вводимой пробы – 25 мкл. Температура термостата колонок – 30 °С.

Для экстракции зеатина культуральную жидкость подкисляли до pH=3 муравьиной кислотой и наносили на катионит Dowex, пропуская со скоростью 1 капля/сек [8]. Патрон предварительно подготавливали последовательным пропуском 5 мл этанола и 5 мл 1М муравьиной кислоты. Прошедшую через катионит культуральную жидкость отбрасывали, а зеатин смывали 6 мл 0,35М гидроксида аммония. Далее элюат нейтрализовывали муравьиной кислотой и наносили на концентрирующий патрон С-18 500 мг фирмы Cromabond (США), пропуская со скоростью 1 капля/сек. Патрон предварительно подготавливали последовательным пропуском 5 мл воды и 5 мл этанола. Прошедшую через патрон пробу отбрасывали, а зеатин смывали 5 мл метанола. Концентрирование экстракта проводили так же, как для ИУК и ГАЗ.

Количественное определение зеатина проводили на вышеупомянутом хроматографе. Источник ионизации – электроспрей (+), напряжение на входном капилляре – -3500 V,

напряжение на ячейке соударения 15 V. Ион - прекурсор: $m/z=220,12$. Колонка ВЭЖХ RP-8 3,5 мкм 4,6x200 мм. Скорость потока элюента 0,5 мл/мин. Подвижная фаза – муравьиная кислота 10 мМ и ацетонитрил (60:40 v/v). Объем вводимой пробы – 10 мкл. Температура термостата колонок – 30 °С.

Эксперимент с кресс-салатом проводили в чашках Петри (d=9см.), семена раскладывали по 10 штук на фильтровальную бумагу, смоченную культуральной жидкостью, разведенной в минеральной смеси Кнопа [4]. Эксперимент проводили в 5 повторностях. Разведения были от 1/1000 до 1/1000000, при меньших разведениях наблюдалось практически полное ингибирование роста проростков. В качестве контроля использовалась смесь Кнопа без добавки культуральной жидкости. Чашки с семенами помещались в термостат на трое суток при температуре 25 °С, после чего проводилось измерение длины корешков и стеблей миллиметровой линейкой. Затем проростки с удаленными остатками эндосперма помещались в доведенные до постоянной массы бюксы (один бюкс на вариант эксперимента) и высушивались при 50 °С в вакуумном шкафу в течение 3 суток. После высушивания бюксы взвешивались на аналитических весах.

Результаты и обсуждение

Мы выбрали 6 наиболее представительных штаммов, проявляющих высокую активность по различным гормонам: D41 - *Metschnikowia pulcherrima*, выделен в респ. Дагестан с листьев винограда; 327v - *Rhodotorula mucilaginosa*, выделен на острове Диксон со мха; 249-1v - *Aureobasidium pullulans*, выделен на Чукотке с поверхности мумии бизона; 2-15 - *Saitozyma podzolica*, выделен в Тверской области с поверхности мумии бизона; SH-19 - *Pseudozyma hubeiensis*, выделен на острове Шри-Ланка с поверхности растений; 25-10 - *Candida trypodendroni*, выделен во Вьетнаме из термитов. Измеренные концентрации фитогормонов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Фитогормональная активность исследованных штаммов

№ штамма	ИУК	Зеатин	ГАЗ	№ штамма	ИУК	Зеатин	ГАЗ
	мкг/л	нг/л			мкг/л	нг/л	
D41	18693,3	3201,3	906,7	2-15	22206,7	0,0	0,0
249-1в	766,7	260,0	340,0	SH-19	60,0	2386,7	0,0
327v	7593,3	150,0	53,3	25-10	5033,3	0,0	460,0

Соответственно, штаммы D41, 249-1v и 327v проявляют высокую активность по всем трем гормонам и обозначаются как «первая группа» – наиболее важные. Сначала было исследовано влияние этих штаммов на рост кресс-салата, чтобы оценить весь возможный спектр эффектов. Оказалось, что культуральная жидкость данных штаммов вызывает сразу

три эффекта: удлинение корня, удлинение стебля и увеличение общей массы проростков (рис. 1).

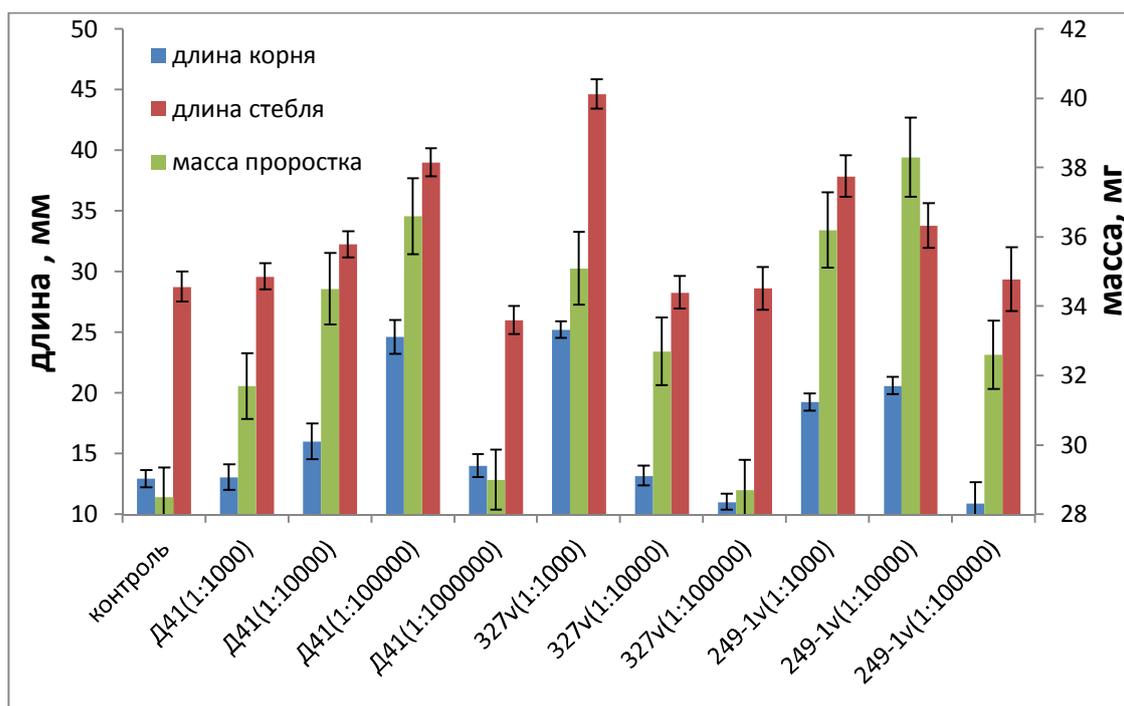


Рис. 1. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс-салата под влиянием культуральной жидкости штаммов D41, 327v и 249-1v в разных разведениях

Корень по сравнению с контролем увеличивается до 2 раз, стебель до 1,5 раз. До 35% увеличивается масса проростков. Наиболее активный продуцент ауксина штамм D41 проявляет максимальную стимуляцию длины корня при разведении 1:100000. Для достижения такого же эффекта культуральную жидкость штамма 327v достаточно развести в 1000 раз. Данный штамм хотя и синтезирует в ауксин, но значительно уступает штамму D41 по максимальной концентрации. Штамм 249-1v стимулирует рост корня заметно слабее, чем два других штамма, при этом он наименее активен в синтезе гормонов, в т.ч. и ауксина. По стимуляции длины стебля и общей массы проростка все штаммы похожи по величине максимальных эффектов, но для их достижения также требуются разные разведения культуральной жидкости (рис. 1).

Для оценки влияния отдельных гормонов в составе культуральной жидкости на рост кресс-салата было проведено фитотестирование штаммов «второй группы» - обладающих разным фитогормональным спектром.

Штамм 2-15 – высокоактивный производитель ауксина, но неспособен к синтезу зеатина и ГА₃. Его культуральная жидкость вызывает стимуляцию роста корней более чем в три раза в разведении 1:100000, что превышает эффект штаммов из первой группы. При этом

увеличения длины стебля не наблюдается. Максимальная прибавка к массе – порядка 16% также в разведении 1:100000, что в 2 раза меньше, чем наблюдалось у штаммов первой группы (рис. 2).

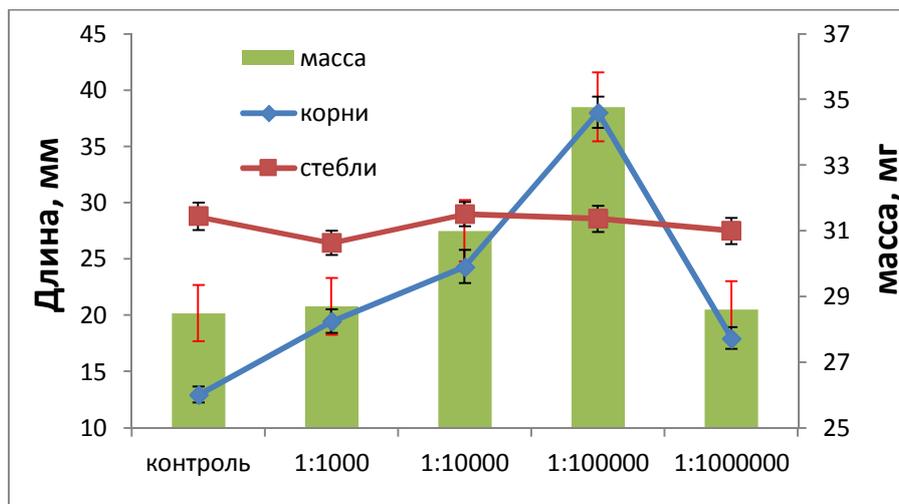


Рис. 2. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс-салата под влиянием культуральной жидкости штамма 2-15 в разном разведении

Культуральная жидкость штамма SH-19, активно синтезирующего зеатин, малоактивного производителя ИУК и не способного к синтезу ГА₃, стимулирует удлинение стебля в 1,5 в максимальном разведении, что не уступает максимальному эффекту, наблюдаемому у штаммов первой группы. Также наблюдается небольшое, порядка 20%, удлинение корня в разведении 1:1000. Прибавка массы такая же, как у штамма 2-15, т.е. в 2 раза ниже, чем у штаммов первой группы (рис. 3).

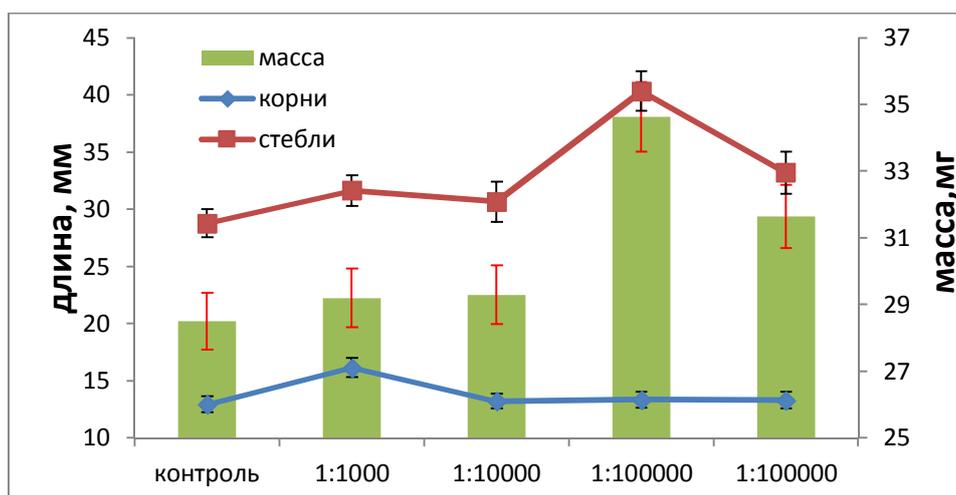


Рис. 3. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс-салата под влиянием культуральной жидкости штамма SH-19 в разном разведении

Штамм 25-10, активный производитель ГА₃ и ИУК, но не способный к синтезу зеатина, в разведении 1:1000 стимулирует удлинение корня в 3,5 раза и одновременно увеличение массы проростков на 18% при отсутствии эффектов на корне, что примерно

соответствует значениям, полученным для штамма 2-15, который также активно синтезирует ИУК и не продуцирует зеатин. В разведении 1:100000 штамм 25-10, не влияя на длину корня, стимулирует удлинение стебля в 1,5 раза, при этом масса проростка увеличивается более чем на 35%, т.е. как у штаммов первой группы. Возможно, этот эффект связан с присутствием ГА₃в культуральной жидкости (рис. 4).

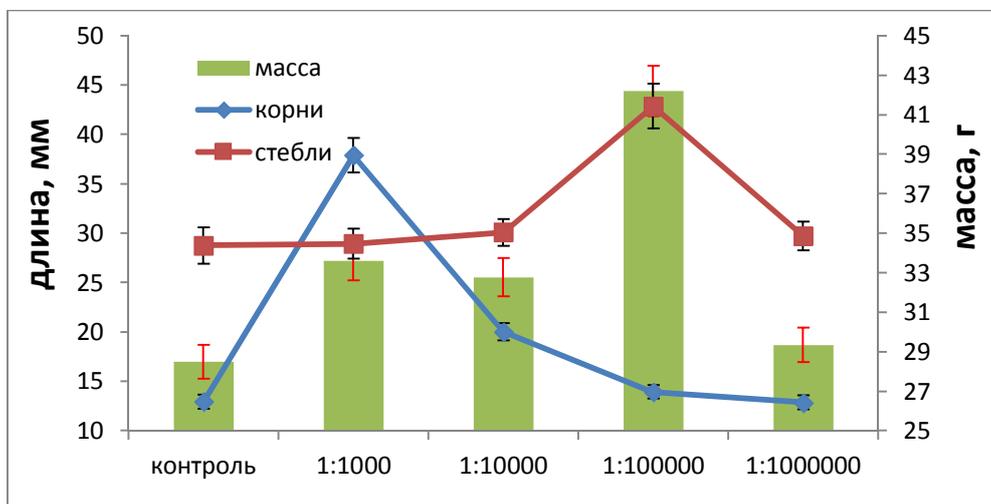


Рис. 4. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (г) проростков кресс-салата под влиянием культуральной жидкости штамма 25-10 в разном разведении

Интенсивность синтеза фитогормонов и выраженность эффектов на рост кресс-салата у разных штаммов дрожжей приведена в таблице 2 в обобщенной форме. Можно видеть, что стимуляция роста корня связана с присутствием ауксина, а на рост стебля влияют ауксин и гиббереллин. Значительное увеличение массы проростка также связано с присутствием гиббереллина. Необходимо учитывать, что фитогормоны действуют совместно, образуя баланс, определяющий эффекты. Нужно иметь в виду, что в культуральной жидкости присутствуют и другие биологически активные вещества, в частности фенольные соединения и органические кислоты, которые также влияют на рост растений. Тем не менее можно констатировать, что дрожжи оказывают разные эффекты на рост проростков, обладая при этом различной фитогормональной активностью. К тому же культуральная жидкость в экспериментах использовалась в большом разведении, когда многочисленные нецелевые соединения оказываются в низких концентрациях и их физиологическая активность должна быть слабо выражена.

Таблица 2

Проявление фитогормональной активности исследованными дрожжами и оказание эффектов на рост проростков кресс-салата

№ штамма	ИУК	Зеатин	ГА ₃	Стимуляция корней	Стимуляция стеблей	Увеличение массы
D41	+	+	+	+	+	+
249-1в	+	+	+	+	+	+

327v	+	+	+	+	+	+
2-15	+	-	-	+	-	+/-
SH-19	+/-	+	-	+/-	+	+/-
25-10	+	-	+	+	+	+

Примечание: (+) - свойство ярко выражено; (+/-) - свойство слабо выражено; (-) - свойство не выражено.

Заключение

Показано, что дрожжи, так же как мицелиальные грибы и бактерии, активно синтезируют растительные гормоны: 3-индолилуксуную кислоту, зеатин и ГА₃. Дрожжи, способные к синтезу одновременно трех фитогормонов, стимулируют рост корней и стеблей кресс-салата, а также вызывают увеличение массы проростков. Дрожжи, отличающиеся фитогормональным профилем, оказывают разные эффекты на рост кресс-салата. Культуральная жидкость штаммов, синтезирующих ИУК, вызывает удлинение корней, синтезирующих зеатин и ГА₃ – удлинение стеблей. Также наблюдается увеличение массы проростков, но максимальных значений оно достигает у только штаммов, способных к синтезу ГА₃. Чем выше концентрация фитогормонов в культуральной жидкости, тем большее разведение требуется для оказания максимального эффекта. Способность дрожжей синтезировать гормоны может быть использована при создании биологических удобрений и ростостимуляторов.

Список литературы

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. / под ред. Ермакова И.П. Физиология растений. - М. : Academia, 2005. – 640 с.
2. Глушакова А.М. и др. Массовое выделение и идентификация дрожжей *Saccharomyces paradoxus* из филлосферы растений // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – №. 2. – С. 236-242.
3. Глушакова А.М., Качалкин А.В., Максимова И.А., Чернов И.Ю. Дрожжи в млечном соке *Hevea brasiliensis* // Микробиология. - 2016. - Т. 85. - № 4. - С. 466-471.
4. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. – М. : Наука, 1968. – 512 с.
5. Медведев С.С. Физиология растений. - СПб. : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.
6. Стрелецкий Р.А., Глушакова А.М., Завгородняя Ю.А., Демин В.В., Чернов И.Ю. Образование 3-индолилуксусной кислоты дрожжевыми грибами разных экологических групп // Микология и фитопатология. - 2013. - Т. 47. - № 2. - С. 116-119.
7. Чернов И.Ю., Марфенина О.Е. Адаптивные стратегии грибов в связи с освоением наземных местообитаний // Палеопочвы и индикаторы континентального выветривания в

истории биосферы. Серия «Геобиологические системы в прошлом». - М. : ПИН РАН, 2010. С. 95–111.

8. Dobrev P.I., Kamnec M. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction // *Journal of Chromatography A*. – 2002. – Т. 950. – № 1. – С. 21-29.

9. Hamayun M., Khan S.A., Khan A.L., Ahmad N., Nawaz Y., Sher H., Lee I-J. Gibberellin producing *Neosartorya* sp. CC8 reprograms Chinese cabbage to higher growth // *Scientia Horticulturae*. – 2011. - Т. 129. - № 3. - P. 347-352.

10. Limtong S., Koowadjanakul N. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Т. 28. – № 12. – С. 3323-3335.

11. Ma Z., Ge L., Lee A.S.Y., Hong Yong J.W., Tan S.N., Ong E.S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction // *Analytica Chimica Acta*. - 2008. - Т. 610. - № 2. - P. 274-281.

12. Nassar A.H., El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K. Promotion of plant growth by an auxin producing isolate of the yeast *Lindnera saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots // *J. Biol. Fertility Soils*. - 2005. - Т. 42. - № 2. - P. 97–108.

13. Sachdev D.P., Chaudhari H.G., Kasture V.M., Dhavale D.D., Chopade B.A. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth // *Indian J Exp Biol*. – 2009. - Т. 47. - № 12. - P. 993-1000.

14. Shimada A., Takeuchi S., Nakajima A., Tanaka S., Kawano T., Kimura Y. Phytotoxicity of Indole-3-acetic Acid Produced by the Fungus, *Pythium aphanidermatum*/ *Biosci., Biotechnol. Biochem.* - 1991. - Т. 63. - № 7. - P. 187-189.