

## ОБРАЗОВАНИЕ ГЕТЕРОАУКСИНА СТРЕПТОМИЦЕТАМИ *S. CANOSUS* 71 И ЕГО НОВЫМИ ВАРИАНТАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ В РЕЗУЛЬТАТЕ $\gamma$ - И КОМБИНИРОВАННОГО ( $\gamma$ + УФ) ОБЛУЧЕНИЯ

*Институт микробиологии АН Молдовы,  
ул. Академией, 1, Кишинев, MD–2028, Республика Молдова  
\* Молдавский государственный университет,  
ул. А. Матеевич, 60, Кишинев, MD–2009, Республика Молдова*

### Введение

Со времени открытия рентгеновских лучей и радиоактивности учеными многих отраслей биологии анализируется клеточный радиобиологический феномен. За этот период накоплен обширный экспериментальный материал о характере морфологических и биохимических изменений в облученной клетке, изучены кинетические закономерности развития лучевого поражения, проведен количественный анализ гибели клеток в облученной популяции [1–3].

Основными физическими факторами, оказывающими влияние на организмы и принятыми в практике биофизических исследований, являются ионизирующие и УФ-излучения. Конечные биологические и генетические эффекты этих излучений оказываются во многом сходными, несмотря на физические различия между ними [4, 5]. Их действие приводит не только к повреждающему или летальному эффектам, но может служить мутагенным и селективным фактором [6].

Под действием мутагенных факторов возникают те же типы изменчивости, что и при спонтанной изменчивости, но с гораздо большей частотой. Особенно это относится к таким морфологическим типам колоний, как аспорогенные, карликовые, секторные. Кроме того, мутагены способны вызвать появление таких вариантов, которые никогда не возникают самопроизвольно [7, 8].

В настоящее время множество публикаций посвящено описанию новых подходов к созданию метаболических путей или новых штаммов, позволяющих повысить биосинтез микроорганизмами антибиотиков, витаминов, аминокислот, липидов, ростовых факторов растений [7, 8]. К ростовым факторам растений относят фитогормоны, витамины и некоторые аминокислоты.

Известно, что актиномицеты — одна из групп почвенных микроорганизмов, активно синтезирующих гетероауксин. Так, было исследовано 100 штаммов разных видов актиномицетов и установлено, что 67% из них синтезируют индолил-3-уксусную кислоту. Некоторые из них (*Act. globisporus*) накапливали до 170 мкг ИУК в 200 мл среды [9].

Функции ауксинов очень разнообразны: они контролируют рост в фазе растяжения, регулируют дифференциальный рост, закладку и дифференцировку корней, опадение листьев, цветение, рост плодов, клубней, луковиц, прорастание семян [10].

Ключевым звеном действия фитогормонов на клетки растений является влияние их на экспрессию генома, т.е. на цепь событий, обеспечивающих синтез белка в клетке. Это влияние осуществляется на уровне транскрипции, например, регуляция фитогормонами функциональной активности хроматина или РНК-полимераз; на посттранскрипционном уровне, например, на изменении и РНК, ее транспорта и запасания, и на уровне трансляции [11].

Есть сообщения о стимуляции ауксинами накопления белков [12], видимая причина этого в резком усилении накопления РНК под влиянием обработки ауксином, что закономерно ведет к усилению синтеза белка. Другая причина в увеличении количества полисом под влиянием ауксина за счет активного синтеза рРНК и иРНК [13]. Наконец, обработка ауксинами в некоторых случаях ведет к появлению новых белков [14].

Учитывая, что биосинтетическую активность любого продуцента можно повысить путем изменения условий культивирования или воздействием на него некоторыми физическими или химическими факторами, целью данной работы являлось изучение способности синтезировать

регуляторы роста стрептомицетом *S. canosus 71* и его новыми вариантами, полученными в результате  $\gamma$ - и комбинированного ( $\gamma$  + УФ) облучения.

### Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись музейный штамм стрептомицетов *Streptomyces canosus 71* и его варианты *S. canosus 71* var. 6 и *S. canosus 71* var. 6–17, полученные в результате  $\gamma$  и комбинированного облучения ( $\gamma$ +УФ). В качестве мутагенных факторов использовали  $\gamma$ - и УФ-лучи.  $\gamma$ -облучение проводили в Институте генетики АН Молдовы на радиационно-химической установке РХМ–  $\gamma$ -20 с активностью 12750 Ки и мощностью 0,67 Гр/с. Облучение ультрафиолетом спор стрептомицетов проводили в лаборатории оптоэлектроники факультета физики Молдавского государственного университета на установке, дающей УФ-лучи с длиной волны 260 нм.

Для выявления в составе культуральной жидкости (КЖ) изучаемых стрептомицетов веществ, стимулирующих корнеобразование, использовали метод Р.Х. Турецкой. Срезанные черенки фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) десятидневного возраста обрабатывали КЖ изучаемых вариантов в различных разведениях (1:25; 1:50; 1:100) в течение 24 часов. Затем жидкость заменяли водопроводной водой, в которой черенки фасоли оставляли на 7 дней до образования на них корешков. Основными показателями физиологической активности стимуляторов роста служили число корней и длина участка стебля, на котором закладываются корни [15].

Физиологически активные вещества из КЖ стрептомицетов экстрагировали диэтиловым эфиром, после отгонки растворителя под вакуумом сухой остаток переводили в 80% этанол. Дальнейшее определение фитогормонов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» марки R254(Avalier, ЧССР), в системе изопропанол : бензол : аммиак в соотношении 4:1:1. Для специфического окрашивания гетероауксина использовали смесь 5% хлорной кислоты (HClO<sub>4</sub>) и 0,05М хлорного железа (FeCl<sub>3</sub>) в соотношении 50:1. В качестве маркера использовали природную индолил-3-уксусную кислоту. Количественное измерение проводили денситометрически, сравнивая интенсивность окраски пятен, полученных при проявлении маркера и опытных образцов [15–17].

Для изучения влияния экзометаболитов (ЭМ) стрептомицетов на прорастаемость семян огурцов (сорта «Родничок») последние замачивали в различных разведениях КЖ (1:100; 1:200; 1:300; 1:400) в течение 24-х часов. Затем семена раскладывали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную водой, и помещали в термостат при температуре 26 °С. Учет результатов проводили через трое суток [15].

Электрофорез водорастворимой фракции белков, экстрагированной из корней и листьев пятидневных проростков огурцов, проводился в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [18].

### Результаты исследований и обсуждение

Варианты *S. canosus 71* var. 6 и *S. canosus 71* var. 6–17, полученные в результате  $\gamma$ - и комбинированного облучения инициальной культуры, отличались от последней по ряду морфологических свойств (табл. 1).

Эти варианты отличались от инициальной культуры и других новых вариантов некоторыми физиологическими свойствами. Высокая удельная скорость роста этих вариантов обуславливала повышенное накопление ими биомассы по сравнению с исходной культурой. Так, например, *S. canosus 71* var. 6 превосходил инициальную культуру по биомассе в 2,5 раза, а *S. canosus 71* var. 6–17 – в 5,3 раза. По содержанию липидов в биомассе варианты оставались на уровне исходного штамма, но фракция фосфолипидов в составе общих липидов превосходила таковую у *S. canosus 71* на 18,7 – 37,8%. Было замечено, что после четырехлетнего хранения при температуре +5 °С и множественных пассажей, а также регулярных проверок на биохимическую активность варианты сохранили указанные свойства, т.е. являются стабильными. Высокая продуктивность, морфологическая и биосинтетическая стабильность, фиксируемая в течение нескольких лет, позволяли рассматривать полученные варианты в качестве перспективных продуцентов биологически активных веществ.

Согласно литературным данным, актиномицеты способны синтезировать не только липиды, антибиотики, витамины, аминокислоты и другие физиологически-активные вещества, но и фитогормоны, в частности, индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). В связи с этим изучаемые варианты были проверены на способность синтезировать гетероауксин. Известно, что при некоторых концентрациях гетероауксин стимулирует процесс корнеобразования у растений, поэтому был проведен тест на органогенез стеблевых черенков фасоли. Этот тест основан на том, что при поступлении в ткани черенка регуляторы роста включаются в обмен веществ, усиливают его отдельные звенья, способ-

ствуя притоку веществ к месту корнеобразования, в результате чего активизируются ростовые процессы [19]. Хотя черенки фасоли хорошо образуют корни и в воде без обработки стимуляторами роста, но число корней и длина участка стебля, на котором закладываются корни, могут служить показателем активности стимуляторов [20].

Таблица 1. Морфология *Streptomyces canosus* 71 и его новых вариантов

Свойства	<i>S. canosus</i> 71	<i>S. canosus</i> 71 вар.6	<i>S. canosus</i> 71 вар. 6–17
Доза облучения	Исходная культура	2000 Гр	$\gamma$ облучение – 1000 Гр УФ лучи – 5400 Эрг/мм <sup>2</sup>
Размер колоний	3,0 – 5,0	10,0 – 12,0	7,0 – 8,0
Форма колоний	круглые, в центре аспорогенный кратер (1,5–2,0 мм)	круглые, в центре аспорогенный кратер (2,0 мм)	круглые в центре, выпуклые
Цвет воздушного мицелия	белый	по центру белый, по краям голубовато-дымчатый	розовато-меловый
Окраска субстратного мицелия	буланный	буланный	темно-фиолетовый
Цвет биомассы	мраморно-розовый	лососево-колерный	серовато-фиолетовый
Цвет КЖ	темно-инкарнатный	хромово-оранжевый	голубовато-зеленый

В наших исследованиях ответные физиологические реакции фасоли на обработку различными разведениями КЖ изучаемых штаммов стрептомицетов оказались очень наглядными: во всех испытываемых разведениях КЖ изучаемых вариантов число образовавшихся корешков оказалось больше, чем в контроле, и четко прослеживалась зависимость количества корней от разведения КЖ. Опыты показали, что оптимальным для исследуемых культур было разведение 1 : 50.

При анализе полученных результатов было выявлено, что наименее активной оказалась КЖ инициальной культуры *S. canosus* 71, хотя число образовавшихся корней на 42,3% превышало контроль, а зона заложения роста была на 16,5% больше, чем в контрольном варианте. Наиболее активно по сравнению с инициальной культурой проявили себя ее новые варианты. При разведении КЖ 1 : 50 число корешков на черенках фасоли превышало контроль на 53,5 и 57,1%, а зона заложения роста — на 22,5 и 24,47% под действием ЭМ *S. canosus* 71 вар. 6 и *S. canosus* 71 вар. 6–17 соответственно.

Для более точной идентификации гетероауксина и его количественного определения была проведена тонкослойная хроматография. Хроматографический анализ эфирного экстракта КЖ стрептомицетов показал наличие зоны, которая специфически окрашивалась как ИУК при обработке силифоловой пластинки реактивом Сальковского и имела  $R_f$ , близкую по значению к  $R_f$  маркера, равную  $\approx 0,35$ .

Учитывая специфичность окрашивания и совпадение  $R_f$  у маркера и опытных вариантов изучаемое вещество можно отнести к ауксинам.

Сравнение интенсивности окраски пятен маркера и опытных образцов позволило определить концентрацию ауксиноподобного стимулятора роста в КЖ изучаемых стрептомицетов. Математические расчеты показали, что *S. canosus* 71 вар. 6 и *S. canosus* 71 вар. 6–17 содержат гетероауксин в количестве – 0,49 и 0,54 мг/л соответственно. Инициальная культура *S. canosus* 71 содержит 0,38 мг/л. При переводе этих значений в молярную концентрацию получили для вариантов *S. canosus* 71 вар. 6 и *S. canosus* 71 вар. 6–17 по  $3,0 \cdot 10^{-6}$  и  $3,3 \cdot 10^{-6}$  М соответственно и  $2,3 \cdot 10^{-6}$  М для *S. canosus* 71. Эти данные подтверждают достоверность результатов, полученных в опыте с черенками фасоли в связи с тем, что по классической схеме Готре (Gauthreut, 1942) количество ауксинов в интервале концентраций  $10^{-7} - 10^{-6}$  М способствует образованию и росту корней [10].

Известно, что метаболиты многих актиномицетов стимулируют развитие различных сельскохозяйственных культур. Установлено также, что стимулирующий эффект при обработке семян КЖ

актиномицетов встречается чаще, чем ингибирование, и проявляется в основном в повышении энергии прорастания и усиленном развитии корней. Это имеет большое биологическое значение, так как становление и укрепление проростков во многом зависит от темпов роста корневой системы [20]. В наших опытах обработка семян огурцов КЖ изучаемых стрептомицетов *S. canosus* 71 и его новых вариантов привела к более активному развитию проростков по сравнению с контролем. Так, например, во всех опытных вариантах общая биомасса проростков была выше, чем в контроле на 5 – 28% (рис. 1).

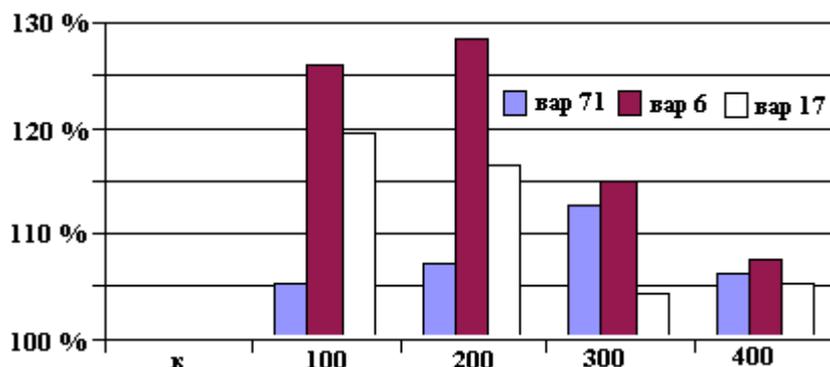


Рис. 1. Влияние ЭМ *S. canosus* 71 и его вариантов на общий вес проростков огурцов. По оси абсцисс – разведения КЖ, по оси ординат – относительный общий вес проростков (по отношению к контролю), %.

Несмотря на то, что стимулирующий эффект наблюдался во всех опытных вариантах, все же наиболее активным, как видно из рис. 1, оказались ЭМ *S. canosus* 71 вар. 6, так как семена, обработанные его КЖ, дали наиболее развитые проростки.

Определение сухого веса корневой системы и надземной части проростков показало, что действие физиологически активных веществ, находящихся в КЖ изучаемых вариантов, в большей степени проявилось на корневой системе.

На рис. 2 и 3 представлены данные о влиянии ЭМ стрептомицетов на развитие надземной части и корней у проростков огурцов. Видно, что количество биомассы надземной части проростков в опыте незначительно превышает контроль, тогда как изменения сухого веса корневой системы более значимы. Для каждого варианта характерно оптимальное разведение КЖ, при котором наблюдаются наиболее высокие результаты. Так, для *S. canosus* 71 оптимальным является разведение 1 : 300, а для его новых вариантов *S. canosus* 71 вар. 6 и *S. canosus* 71 вар. 6–17 — 1 : 200 и 1 : 300 соответственно; при этом масса корневой системы увеличивалась соответственно на 12,4; 20,4 и 16,9%. Судя по полученным данным, варианты *S. canosus* 71 вар. 6 и *S. canosus* 71 вар. 6–17 более активно стимулируют рост проростков по сравнению с исходной культурой.

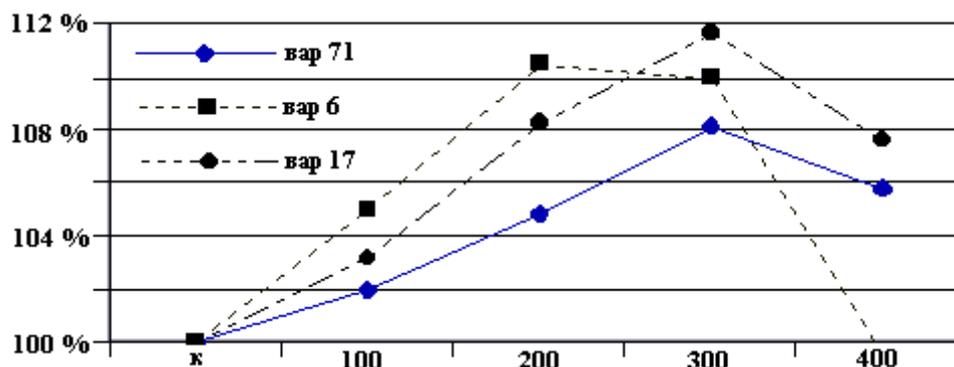


Рис. 2. Влияние ЭМ *S. canosus* 71 и его вариантов на надземную часть проростков огурцов. По оси абсцисс – разведения КЖ, по оси ординат – относительный вес проростков (по отношению к контролю), %.

Подобные результаты были получены при замачивании семян огурцов и в растворе ИУК с концентрацией  $1,15 \cdot 10^{-8}$  М, что соответствует содержанию ауксинов в КЖ варианта *S. canosus* 71 вар. 6–17, разведенной в 200 раз. Определение массы надземной части проростков и корней растений

опытной группы показало, что она увеличилась на 12 и 19% соответственно по сравнению с контролем.

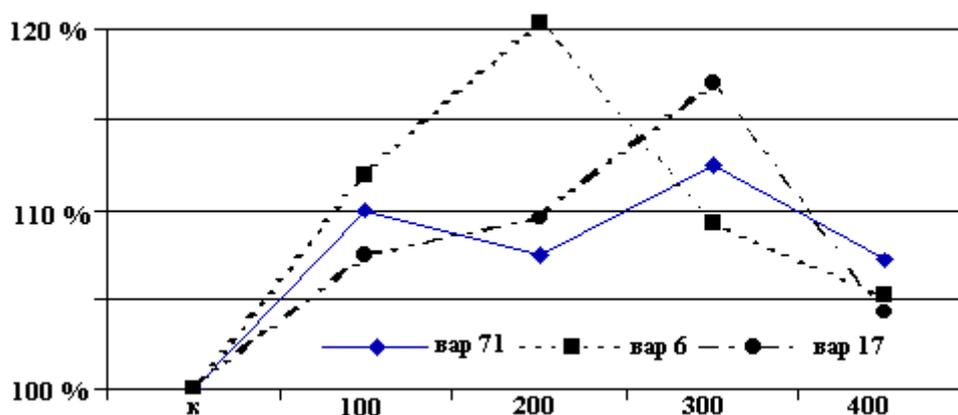


Рис. 3. Влияние ЭМ *S. canosus 71* и его вариантов на развитие корней у проростков огурцов. По оси абсцисс – разведения КЖ, по оси ординат – относительный вес корней (по отношению к контролю), %.

Из пятидневных проростков огурцов, полученных из семян, обработанных КЖ варианта *S. canosus 71* вар. 6–17, была экстрагирована водорастворимая фракция белков, которая наиболее богата биомолекулами, посредством которых реализуется действие генов.

Данные, представленные в табл. 2, указывают на наличие определенной зависимости между содержанием белка в семядолях и корнях проростков огурцов и дозой ауксина в составе ЭМ стрептомицетов. Видно, что при оптимальных разведениях КЖ, а значит, при физиологических концентрациях ауксинов, увеличивается содержание белка относительно контроля: на 25% в корнях и на 35% в семядолях. При пороговых разведениях КЖ наблюдается снижение общего количества белка по сравнению с оптимумом разведения и незначительно по сравнению с контролем. Таким образом обработка пятидневных проростков огурцов ЭМ стрептомицетов вызывает стимуляцию накопления белка. О качественном изменении белка позволяют судить данные электрофореза. Были получены электрофореграммы растворимых белков корней и семядолей пятидневных проростков огурцов, семена которых были инкубированы в КЖ *S. canosus 71* вар. 6–17 соответствующего разведения (рис. 4 и 5).

Таблица 2. Содержание белков водорастворимой фракции в пятидневных огуречных проростках из семян, обработанных КЖ *S. canosus 71* вар. 6–17

Разведение	Содержание белка в семядолях, г	% к контролю	Содержание белка в корнях, г	% к контролю
Контроль	0,0071	100,0	0,0030	100,0
1 : 100	0,00529	74,5	0,00295	98,13
1 : 200	0,0085	119,7	0,00375	125,0
1 : 300	0,0096	135,0	0,0032	106,6
1 : 400	0,0076	107,04	0,0031	103,3

При сравнении белковых треков, соответствующих контролю и опытным пробам, было отмечено утолщение некоторых зон, что свидетельствует о повышении концентрации данного белка после обработки семян огурцов различными разведениями КЖ стрептомицетов.

На электрофореграмме белков корней пятидневных проростков огурцов видно утолщение трех белковых зон в пробе, соответствующей инкубации в оптимуме разведения КЖ, на электрофореграмме белка семядолей увеличена концентрация одного белка, причем белки, концентрация которых увеличивается, являются низкомолекулярными. Этот факт, а также то, что данные белки принадлежат к водорастворимой фракции, которая наиболее богата ферментами, регуляторными белками и другими биомолекулами, посредством которых реализуется действие генов, наводит на мысль, что низкомолекулярные белки, концентрация которых увеличивается под воздействием стимуляторов

роста из КЖ стрептомицетов, в частности, ауксинов, являются, возможно, регуляторами белками, которые участвуют во многих метаболических процессах. Ведь известно, что имеются специфические белки, возникающие под влиянием фитогормонов, которые связываются с РНК-полимеразой, изменяя ее активность. В результате этого она способна узнавать новые промоторы на ДНК, что ведет к увеличенному синтезу новых р-РНК, образованию новых рибосом и активизации синтеза белка.

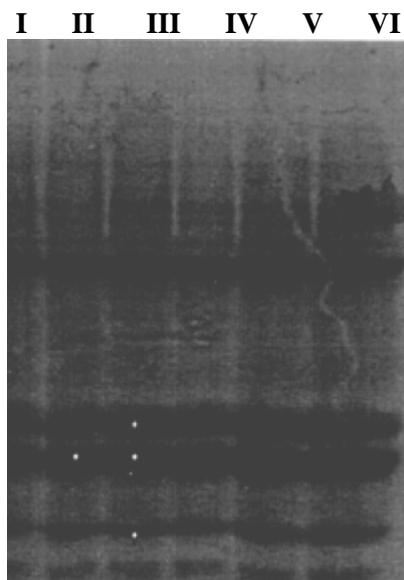


Рис. 4. Электрофореграмма водорастворимых белков корней пятидневных проростков огурцов, семена которых были обработаны КЖ *S. canosus* 71 вар. 6–17: I и VI – контроль, II – разведение КЖ 1 : 100, III – разведение КЖ 1 : 200; IV – разведение КЖ 1 : 300, V – разведение КЖ 1 : 400.

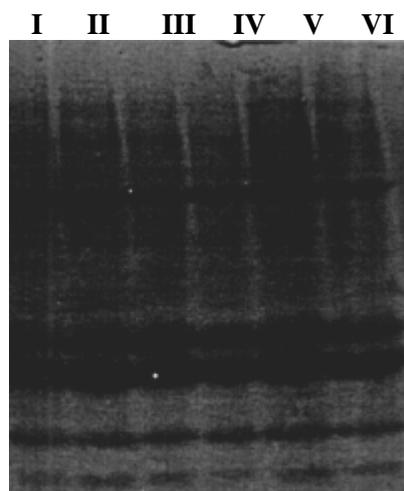


Рис. 5. Электрофореграмма водорастворимых белков семядолей пятидневных проростков огурцов, семена которых были обработаны КЖ *S. canosus* 71 вар. 6–17: I и VI – контроль, II – разведение КЖ 1 : 100, III – разведение КЖ 1 : 200, IV – разведение КЖ 1 : 300, V – разведение КЖ 1 : 400.

Наличие этих низкомолекулярных белков в меньшей концентрации и в контроле может быть объяснено присутствием в проростках огурцов эндогенных ауксинов, которые оказывают такое же влияние на рост и развитие растений, но в меньшей степени, нежели в совокупности с экзогенными ауксинами из КЖ стрептомицетов, в результате чего наблюдается стимуляция синтеза белков, новообразование которых происходило в клетке до представления ей гормона экзогенно.

Таким образом, проведенные исследования показали, что у музейного штамма *S. canosus* 71 после  $\gamma$ - и комбинированного облучения произошли изменения не только морфологические (форма, размер, цвет колоний, окрашивание субстратного мицелия, способность синтезировать окрашивающие среду пигменты и пр.), но и физиолого-биохимические. Так, помимо повышения биопродуктив-

ности (увеличение образования биомассы в 2,5 – 5,3 раза, фракции фосфолипидов на 18,7 – 37,8% и т. д.) отмечено содержание в комплексе ЭМ такого биологически важного регулятора роста растений, как гетероауксин. Установлено, что отселекционированные варианты, полученные после  $\gamma$ -облучения *S. canosus 71* в дозе 2000 Гр (*S. canosus 71* var. б) и комбинированного облучения *S. canosus 71* var. б дозами 1000 Гр + 5400 Эрг/мм<sup>2</sup> (*S. canosus 71* var. б–17), способны синтезировать такое количество фитогормона, которое оказывает благоприятное действие на рост и корнеобразование сельскохозяйственных растений, а также способствует стимуляции накопления водорастворимых белков в растениях.

Полученные данные показывают возможность использования новых вариантов *S. canosus 71*, отселекционированных после воздействия  $\gamma$ - и комбинированного облучения, для создания высокоактивных биопрепаратов – стимуляторов роста растений и в селекционной работе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ли Д.Е. Действие радиации на живые клетки. М., 1963. С. 5–13.
2. Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология. М., 1973. С. 20–25.
3. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Основы радиационной биофизики. М., 1982. С. 118–150.
4. Захаров И.А., Кривиский А.С. Радиационная генетика микроорганизмов. М., 1972. С. 14–19.
5. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. М., 1988. С. 57–114.
6. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации (корине- и нокардиоподобные бактерии). М., Изд-во МГУ, 1991. С. 144.
7. Алиханян С.И. Селекция промышленных микроорганизмов. М., 1968. С. 201–205.
8. Алиханян С.И., Акифьев А.П. Общая генетика М., 1985. С. 41–48.
9. Сабельникова В.И. Биологически активные вещества клубеньковых бактерий. Кишинев, 1979. С. 22.
10. Калинин Ф.Л. Биологические вещества в растениеводстве. Киев, 1984. С. 68.
11. Кулаева О.Н. Цитокинины и их физиологическое действие. М., 1971. С. 46–47.
12. Гамбург К.З. Биохимия ауксина и его действие на клетки растений. М., 1976. С. 166–173.
13. Fites et al, 1969. Gwozdz et al, 1974. Цит. Калинин Ф.Л. Биологически активные вещества в растениеводстве. Киев, 1984. С. 84–103.
14. Бутенко Р.Г., Володарский А.Д. Специфика антигенов в цикле клеточных превращений // Физиология растений 1967. Т.14. № 6. С. 965–971.
15. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. Л., 1969. С. 82–86.
16. Филимонова М.В., Мазин В.В. Физиологически активные вещества культуральной жидкости гриба *Botrytis cinerea*. // Физиология растений. 1986. Т. 33. № 1. С. 88–93.
17. Сердюк О.П., Смольгина Л.Д., Корсунский О.Ф., Гоготов И.Н. Экзометаболиты с фитогормональной биологической активностью, образуемые симбиотической ассоциацией *Azolla-Anabaena azollae* // ДАН СССР. 1991. Т. 316. № 2. С. 492–494.
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage. T.4 Nature. 1970. Vol. 227. № 5259. P. 680.
19. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига, 1988. С. 11–29.
20. Верниченко А.А. Взаимоотношения актиномицетов и озимой пшеницы // Методы микробиологического стимулирования роста и развития растений. Рига, 1969. С. 63–64.

Поступила 11.07.2001

## Summary

It was presents the results of the comparative analysis on morphological properties of strain *S. canosus 71* and its new variants, obtained after  $\gamma$ - and combined ( $\gamma$ - and UV-rays) irradiation was conducted. The new selected variants ability for heteroauxin synthesis was determined. The streptomycetes culture liquid, contained this phytohormone, exerted positive action on the growth and rizogenesis of agricultural plants and promoted the stimulation of water-soluble proteins accumulation in plants.