

НОВЫЕ ЦИТОКИНИНПОДОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*

© 2011 С.П. Четвериков, О.Н. Логинов

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 20.06.2011

В данной статье представлены результаты исследования химической природы новых метаболитов с фитогормональной активностью бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, метаболиты, цитокинины.

В последнее время растет интерес к экологически чистым и сравнительно безопасным в применении микробиологическим средствам защиты растений. Основное преимущество биологического метода по сравнению с химическим – отсутствие отрицательного влияния на окружающую среду.

Фитогормоны играют важную роль как регуляторы роста и развития растений. Использование природных фитогормонов микробного происхождения в растениеводстве весьма перспективно ввиду простоты их получения, сравнительной дешевизны, высокой способности их к детоксикации в растительном организме, а также способности легко связываться в клетке и катаболизироваться. Кроме того, с помощью микробов можно получить фитогормональные соединения со структурой, отличной от структуры коммерческих препаратов, но обладающие более высокой биологической активностью, которые сложно получить путём химического синтеза [1].

Некоторые представители бактерий рода *Pseudomonas* способны стимулировать рост и развитие растений, в связи с чем разработка и внедрение в сельскохозяйственную практику биологических препаратов на их основе приобретает особое значение.

Целью настоящей работы было изучение химической природы новых метаболитов с фитогормональной активностью штамма бактерий *P. chlororaphis* ИБ6.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований являлся штамм бактерий из Коллекции микроорганизмов Института биологии УНЦ РАН *P. chlororaphis* (= *P. aureofaciens*) ИБ6, обладающий совокупностью полезных для растений свойств, такими как синтез антифунгальных антибиотиков и ростстимулирующих веществ [2, 3]. Микроорганизмы культивировали в течение 3 сут при температуре 28°C в жидкой питательной среде, содержащей (г/л): гли-

церин – 20; дрожжевой автолизат – 0,01; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 10,0; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5; FeCl_3 – 0,01.

Низкомолекулярные фракции (НМФ) метаболитов получали, и выделение отдельных компонентов из них проводили при помощи препаративной ВЭЖХ в системе, состоящей из насоса высокого давления модели 572P (“Gasukuro Kogyo”, Япония), УФ-детектора (“Du Pont”, США). Для разделения использовали колонку из нержавеющей стали с сорбентом Zorbax-ODS (250x21,1 мм, “Shimadzu”, Япония). Образцы вводили с помощью дозатора модели 7125 (“Rheodyne”, США) с петлей объемом 500 мкл. В качестве элюента использовали воду, подвергнутую дополнительной очистке, при скорости элюции 10,0 мл/мин. Регистрировали поглощение при длине волны 254 нм [4].

Фитогормональную активность компонентов НМФ определяли известным методом при помощи иммуоферментного анализа [5].

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord M40 (“Carl Zeiss”, Германия) в области 200–300 нм (в воде).

Масс-спектры химической ионизации были получены электрораспылением (электроспрей) на квадрупольном жидкостном хромато-масс-спектрометре LCMS-2010 EV (“Shimadzu”, Япония) (шприцевой ввод, раствор образца в ацетонитриле или в воде при расходе 60 мкл/мин, элюент – ацетонитрил/вода в соотношении 50/50).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее были выявлены параметры питательной среды для культивирования бактерий *P. chlororaphis* ИБ6, позволяющие получать культуральную жидкость этих бактерий с концентрацией цитокининов свыше 1100 нг/мл, при этом также наблюдалась ее высокая антигрибная активность [4].

Хроматографический профиль НМФ образца с максимальной фитогормональной активностью был представлен 3 компонентами, один из которых обладал антигрибной активностью, два других – вещества цитокининовой природы (рис. 1а).

При хроматографическом разделении компонент с антигрибной активностью первым элюировал с колонки и не имел ярко выраженного максимума

Четвериков Сергей Павлович, канд. биол. наук, e-mail: che-kov@mail.ru, Логинов Олег Николаевич, докт. биол. наук, проф., e-mail: biolab316@yandex.ru

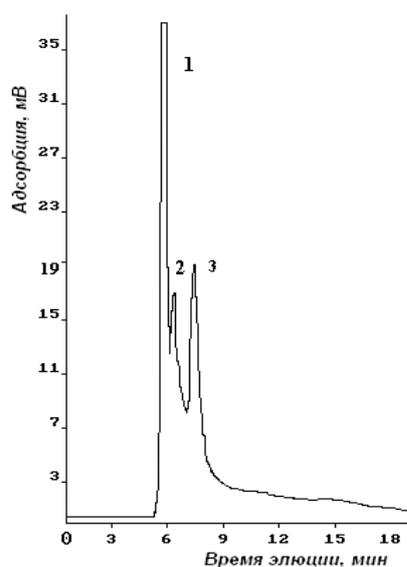
поглощения в УФ-области. Остальные компоненты фракции имеют максимумы УФ-поглощения в интервале от 255 до 280 нм, характерные для регуляторов роста растений, что и было подтверждено данными иммуноферментного анализа. Причем максимум поглощения одного из исследуемых компонентов находился при длине волны 267 нм (рис. 1б), можно было предположить, что это цитокинин зеатин, а максимальная абсорбция другого компонента цитокининовой природы наблюдалась при 257,5 нм (рис. 1в).

В дальнейшем методом хромато-масс-спектрографии было подтверждено предположение о том, что один из компонентов с фитогормональной активностью является зеатином, ему соответствует пик с максимумом отношения массы к заряду, равным 220 (рис. 2а).

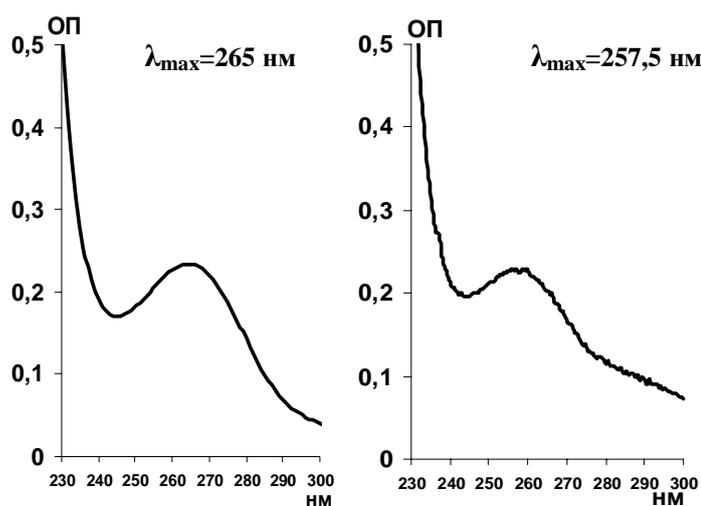
Структура другого компонента представляется более интересной и новой для веществ цитокининовой природы.

В результате интерпретации масс – спектра ее можно представить как трипропионил - N⁶ - (Δ^2 - изопентенил)аденозин (рис. 2б), которому соответствует пик с отношением массы к заряду, равным 504. В спектре присутствуют фрагменты оснований цитокининов с m/z 136 (аденин), 204 (N⁶ - (Δ^2 - изопентенил)аденин).

Наличие трипропионилрибозы обусловлено фрагментом с m/z 301, дальнейшее отщепление от которой двух молекул пропионовой кислоты приводит к фрагменту с m/z 153, последующее отщепление метилкетеновой группы – к фрагменту с m/z 97.



а



б

в

Рис. 1. Хроматографический профиль (а) НМФ КЖ штамма *P. chlororaphis* ИБ 6, компоненты фракции: 1 – с антигрибной активностью, 2, 3 – с фитогормональной активностью, и УФ – спектры метаболитов, выделенных из НМФ: б – компонента 2, в – компонента 3.

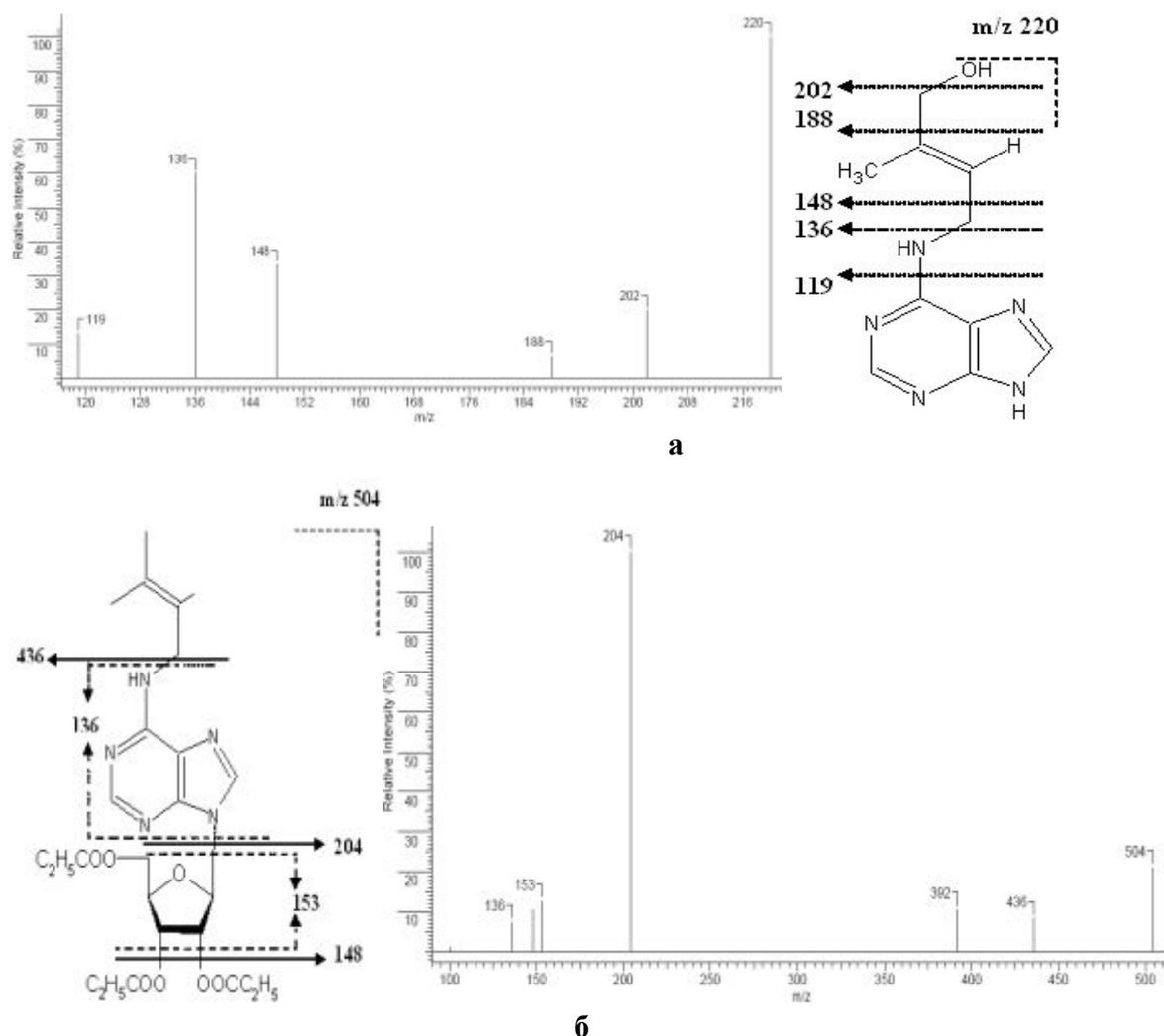


Рис. 2. Масс-спектры компонентов с фитогормональной активностью, выделенных из низкомолекулярной фракции метаболитов КЖ штамма *P. chlororaphis* ИБ 6. Прим.: а – компонента 2 из рис. 1а, б – компонента 3 из рис. 1а.

Таким образом, выявлены условия максимальной продукции штаммом *P. chlororaphis* ИБ 6 веществ цитокининовой природы, позволяющие получать культуральную жидкость этих бактерий с концентрацией цитокининов свыше 1100 нг/мл, представленных в том числе и трипропионил - N⁶ - (Δ^2 - изопентенил)аденозином – новой формой цитокининоподобных веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига: Зинатне, 1988. 151 с.
2. Логинов О.Н., Четвериков С.П., Гусаков В.Н. Триглицеридпептиды – новая группа антигрибных метаболитов псевдомонад (*Pseudomonas*) // ДАН. 2003. Т. 393. № 5. С. 715-717.
3. Патент РФ № 2260951 / 27, 2005.
4. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* // Биотехнология. 2009. № 3. С. 67-71.
5. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каровайко Н.И. Иммуноферментная система для определения цитокининов // Физиология растений. 1990. Т. 37. Вып. 1. С. 193-199.

NEW CYTOKININE METABOLITES OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*

© 2011 S.P. Chetverikov, O.N. Loginov

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

In given article are presented results of the study of the chemical nature of new phytohormonally activity metabolites of *Pseudomonas chlororaphis* IB 6.

Key words: *Pseudomonas*, metabolites, cytokinins.

Chetverikov Sergey Pavlovich, Candidate of Biology, e-mail: che-kov@mail.ru, Loginov Oleg Nikolaevich, Doctor of Biology, Professor, e-mail: biolab316@yandex.ru.