

10. Методические указания по гаметной селекции сельскохозяйственных растений (методология, результаты и перспективы) / Под ред. В.Ф. Пивоварова. М., 2001.

Поступила в редакцию 14.03.05.

Марина Алексеевна Стадниченко - аспирант кафедры ботаники. Научный руководитель - В.Д. Поликсенова.

Валентина Дмитриевна Поликсенова - кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, заведующая кафедрой ботаники.

УДК 579.083.11

И.Н. ФЕКЛИСТОВА, Н.П. МАКСИМОВА

СИНТЕЗ ФЕНАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* B-162

We have established that bacteria *P. aurantiaca* B-162 poses *phzC*, *phzD* and *phzE* genes and produces orange pigment with antimicrobial activity - phenazine (spectral peak maximal are 240 and 368 nm, molecular weight is 180 Da). Induction of phenazine synthesis was stimulated by fructose, glucose, glycerin and sucrose. Malonate, succinate, tryptophan, *n*-aminohybenzoic and *n*-hydroxybenzoic acid inhibited the phenazine production.

Ранее нами было показано, что бактерии *Pseudomonas aurantiaca* B-162 проявляют антимикробную активность в отношении ряда фитопатогенных микроорганизмов - возбудителей корневых и стеблевых гнилей злаков, хлорозов, плодовой гнили, бледного и темного аскохитозов гороха: *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, а также *E. herbicola*, *E. carotovora*, *P. pisi*, *P. glycinea* и *P. syringae* [1].

К числу наиболее эффективных антимикробных метаболитов, синтезируемых ризосферными бактериями, можно отнести феназиновые пигменты, которые представляют собой редокс-активные соединения с широким антибиотическим спектром действия в отношении грибов и бактерий [2-6].

Известно более 50 типов феназиновых соединений, синтезируемых различными видами *Pseudomonas*, в частности, феназин-1-карбоксилат (*P. fluorescens* и *P. aureofaciens*), 4,9-диоксифеназин (*P. ceracia*), феназин-1-карбоксамид (*P. chlororaphis*), иодинин (*P. iodina* и *P. phenazinium*), аэругинозин (*P. aeruginosa*), 2-оксифеназин-1-карбоксилат и 2-оксифеназин (*P. aureofaciens*). Как правило, бактерии одного и того же штамма могут продуцировать несколько типов феназиновых пигментов. Например, бактерии *P. aeruginosa* синтезируют пиоцианин, феназин-1-карбоксилат, феназин-1-карбоксамид и 1-оксифеназин, тогда как для представителей *P. chlororaphis* характерна продукция феназин-1-карбоксамид, хлорорафина и феназин-1-карбоксилата [4, 5]. Все названные соединения синтезируются из общего предшественника - феназин-1,6-дикарбоксилата, который образуется в результате симметричной конденсации двух молекул хоризмата (рис. 1). Следует отметить, что в настоящее время путь синтеза феназиновых соединений у бактерий *Pseudomonas* полностью не расшифрован. Наиболее изучены начальные этапы, невыясненным остается вопрос синтеза феназина, иодинина, 2-оксифеназина и т. д.

Целью данной работы являлась идентификация феназинового пути, установление типов феназиновых пигментов и оптимизация условий их синтеза у бактерий *P. aurantiaca* B-162.

Материал и методика

Штамм *P. aurantiaca* B-162 (коллекционный номер ВКМВ-162) был получен из коллекции кафедры генетики БГУ. Бактерии выращивали в среде (pH 7,2), содержащей Difco пептон (0,2 %), фруктозу (1 %), NaCl (1 %), KNO₃ (0,1 %), в течение 5 сут без аэрации. В отдельных экспериментах в качестве источника углерода использовали глюкозу, глицерин, фруктозу, триптофан, *n*-оксибензоат, *l*-аминобензоат, малонат и сукцинат (1 %).

Выделение пигмента осуществляли по схеме, предложенной в работе [7]. Феназиновый пигмент анализировали на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором LCMS-QP8000α (Shimadzu, Japan). Аликвоту

образца объемом 20 мкл наносили на обратнофазную колонку Restec Allure C18 (150 X 4,6 мм; 5 мкм; 60 А). Элюцию осуществляли со скоростью 0,5 мл/мин при 40 °С мобильной фазой, содержащей ацетонитрил и 0,1 % уксусной кислоты (0-15 мин - линейный градиент от 10 до 100 % ацетонитрила; 15-30 мин - 100% ацетонитрил (изократический режим)). Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием электроспрей-интерфейса, настроенного на положительную ионизацию. Напряжение капилляра электроспрея равнялось 4,5 кВ. Скорость потока азота, применявшегося в качестве распыляющего газа, составляла 4,5 л/мин, температура десольватора - 250 °С. Регистрация велась в сканирующем режиме регистрации ионов с соотношением масса/заряд в диапазоне

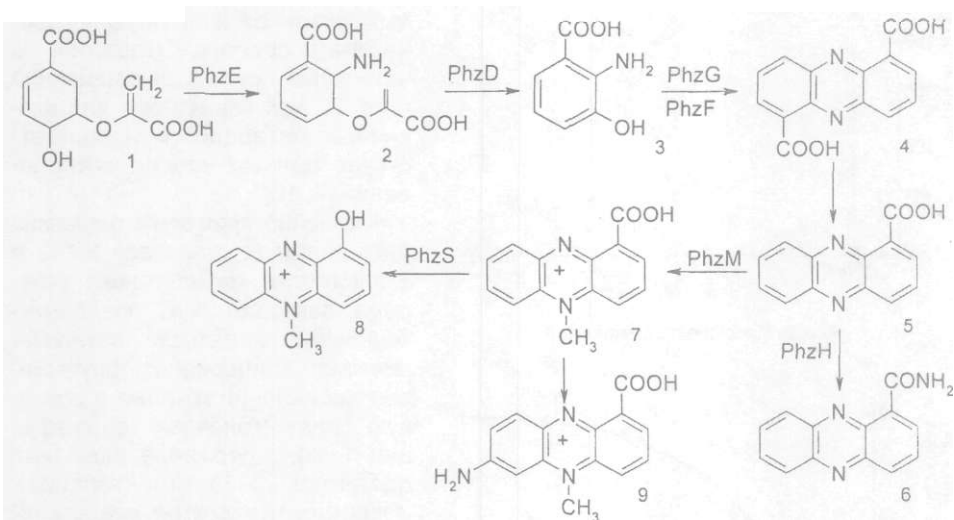


Рис. 1. Образование феназиновых пигментов у бактерий рода *Pseudomonas*: 1 - хоризмат; 2 - аминоксидеоксиизохоризмат; 3 - 3-оксиантранилат; 4 - феназин-1,6-дикарбоксилат; 5 - феназин-1-карбоксилат; 6 - оксиклорорафин; 7 - 5-метилфеназин-1-карбоксилат; 8 - пиоцианин; 9 - азургинозин

Электрофоретический анализ и выделение фрагментов ДНК из геля проводили согласно [8]. Размер фрагментов ДНК устанавливали по электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве маркерной ДНК использовали Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (Fermentas). Режим полимеразной цепной реакции был следующим: 94 °С - 5 мин (один цикл); 94 °С - 20 с, 51 °С - 30 с, 72 °С - 1 мин (30 циклов) - с использованием прямых и обратных праймеров:

phzC forward - 5'-CGC GGA TCC ATG GAA GAC TTA CTG AAA CGG GT-3';
 phzC reverse - 5'-CGC GGA TCC TCA GTC CAC CAC ACG GG-3';
 phzD forward - 5'-CGC GGA TCC ATG ACC GGC ATT CCA TCG ATC-3';
 phzD reverse - 5'-CGC GGA TCC TCA TAG CAC CAC CTC ATG GC-3';
 phzE forward - 5'-CGC GGA TCC ATG AGC CAA GCC GCC GC-3';
 phzE reverse - 5'-CGC GGA TCC TTA TCT CCC GGC GGC CG-3'.

Результаты и их обсуждение

Результаты ПЦР-анализа позволили выявить наличие у бактерий *P. aurantiaca* В-162 phzC, phzD и phzE генов (1200, 620 и 830 п. о. соответственно). Ранее было показано, что ген phzC входит в состав феназинового оперона, однако его роль в процессе биосинтеза данных соединений еще до конца не установлена [4]. phzD катализирует превращение аминоксидеоксиизохоризмата в 3-оксиантранилат (см. рис. 1), а продукт гена phzE, обладая схожестью с компонентом I антранилат-синтазы [9], является поставщиком субстрата для реакции, осуществляемой phzD. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что бактерии *P. aurantiaca* В-162 имеют генетическую систему, обеспечивающую синтез феназиновых пигментов.

Для установления конкретных типов синтезируемых *P. aurantiaca* В-162 феназиновых соединений был проведен масс-спектрометрический анализ очи-

ценного препарата пигментов. Как видно из результатов, приведенных на рис. 2, молекулярная масса основного компонента составляет 180 Да, максимум поглощения которого наблюдается при 240 и 369 нм, что соответствует феназину (C₁₂H₈N₂). Второй компонент массой около 256 Да, по-видимому, феназин-1,6-дикарбоксилат, который является общим предшественником всех феназиновых пигментов (см. рис. 1). Следовательно, феназиновый комплекс, продуцируемый *P. aurantiaca* В-162, представлен в основном феназином; другие пигменты, в частности феназин-1-карбоксилат, оксихлорографин, 5-метилфеназин-1-карбоксилат, пиоцианин и аэругинозин, исследуемым штаммом не синтезируются.

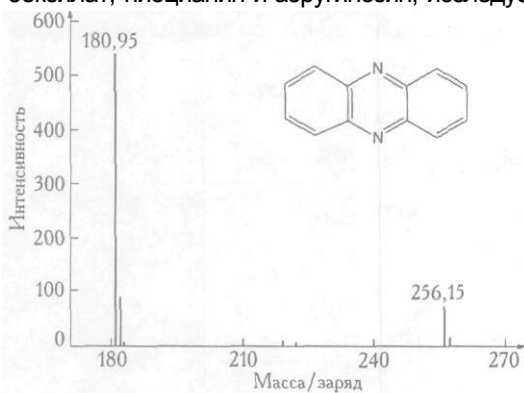


Рис. 2. Масс-спектр феназина



Рис. 3. Накопление феназина в среде бактериями *P. aurantiaca* В-162

Образование феназина бактериями *P. aurantiaca* В-162 при росте на различных источниках углерода

Источник углерода	Концентрация феназина, мг/л	Источник углерода	Концентрация феназина, мг/л
Сахароза	23,5±2	Цитрат	2,5±0,5
Глюкоза	35,7±3	Малонат	0,90±0,4
Фруктоза	28,3±4	Сукцинат	0,85±0,2
Глицерин	19,2±2	п-Аминобензоат	0,77±0,5
Триптофан	6,4±0,7	п-Оксибензоат	0,95±0,6

п-оксибензоат, вызывают значительное снижение образования пигмента (концентрация феназина в культуральной жидкости составляла менее 1 мг/л). Влияние источника углерода на продукцию феназиновых пигментов и изменение их спектра было отмечено ранее для бактерий *P. aeruginosa* и *P. chlororaphis* [1,9].

Добавление в среду триптофана также приводило к снижению выхода феназина (см. таблицу). Ранее нами было показано, что у изучаемого штамма данная ароматическая аминокислота обладает ингибирующим эффектом по отношению к ключевому ферменту ароматического пути - ДАГФ-синтазе [12]. Следовательно, наличие триптофана в ростовой среде приводит к снижению активности этого фермента и соответственно уровня хоризмата, являющегося предшественником феназинов.

В результате оптимизаций условий культивирования бактерий *P. aurantiaca* В-162 выявлено, что максимальная концентрация феназина в среде наблюдается на четвертые сутки выращивания (рис. 3), что характерно для вторичных метаболитов и соответствует данным других исследований [7, 10].

Изучение продукции феназина бактериями *P. aurantiaca* В-162 в зависимости от источника углерода показало, что предпочтительными являются сахароза, глюкоза, глицерин и фруктоза, при добавлении которых в ростовую среду (конечная концентрация 1 %) содержание феназина достигало 28-36 мг/л (таблица). Известно, что другие представители рода *Pseudomonas* обладают меньшей продукционной способностью: бактерии *P. chlororaphis* синтезируют 18,1 мг/л феназин-1-карбоксилата и 1 мг/л феназин-1-карбоксиамида, а *P. aeruginosa* - 22 мг/л оксихлорографина и 26 мг/л феназин-1-карбоксилата [7, 11]. Таким образом, штамм *P. aurantiaca* В-162 может являться основой для создания продуцента феназина.

Как видно из полученных нами данных (см. таблицу), такие источники углерода, как малонат или сукцинат, а также л-амино-

Таким образом, источник углерода существенно влияет на синтез феназинового пигмента бактериями *P. aurantiaca* В-162. Можно предположить, что биосинтез антимикробных агентов в естественных условиях способен индуцироваться органическими веществами, выделяемыми растениями в ризосферу.

Авторы благодарят научного сотрудника кафедры биохимии биологического факультета БГУ Е.О. Корик за проведение HPLC-анализа.

1. Феклистова, И. Н. // Актуальные проблемы изучения фито- и микобиоты: Тр. Междунар. науч.-практ. конф. Мн., 2004. С. 201.
2. Штарк, О.Ю., Шапошников, А.И., Кравченко, Л. В. // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 645.
3. Georgakopoulos, D.G. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. Vol. 60. P. 2931.
4. Мавроди, Д. В. и др. // Мол. биология. 1997. Т. 31. С. 74.
5. Byung, G.S., Eustice, D.C., Jensen, R.A. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 138. P. 846.
6. Mavrodi, D.V. et al. // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. P. 2541.
7. Levitch, M.E., Stadman, E. R. // Arch. Biochem. Biophys. 1964. Vol. 106. P. 194.
8. Маниатис, Т., Фрич, Э., Сэмбрук, Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
9. Э. Смирнов, В.В., Киприянова, Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев, 1990.
10. Mavrodi, D.V. et al. // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183. P. 6454.
11. Chang, P.C., Blackwood, A. C. // Can. J. Microbiol. 1969. Vol. 15. P. 439.
12. Феклистова, И.Н., Максимова, Н.П. // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. М., 2004. С. 165.

Поступила в редакцию 09.02.05.

Ирина Николаевна Феклистова - аспирант кафедры генетики. Научный руководитель - Н.П. Максимова.

Наталья Павловна Максимова - кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой генетики.

УДК 591.532:595.763(476)

В. И. ХВИР

НАСЕКОМЫЕ - ПОСЕТИТЕЛИ СОЦВЕТИЙ БОДЯКА ПОЛЕВОГО (*CIRSIIUM ARVENSE* (L.) SCOP.) В УСЛОВИЯХ ЗАПАДА ЦЕНТРАЛЬНОГО РАЙОНА БЕЛАРУСИ

It is establish the complex of the families of insects that visited the flowers of the thistle (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). It is determined the dominating groups of the pollinators.

Насекомые - посетители цветков, в том числе, собственно антофильные формы, являются неотъемлемым компонентом консорциев цветковых растений. Изучение консорциев сорных растений не только дает представление о характере взаимодействий между растительным и животным компонентами биоценозов, но и позволяет выделить те комплексы видов фитофагов и антофилов, которые оказывают значимое влияние на воспроизведение и распространение сорняков. Одной из таких важных для энтомофильных растений групп являются опылители, исследования которых проводились нами на бодяке полевом.

Бодяк полевой (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) - корнеотпрысковый многолетник, распространен по всей территории Беларуси. Произрастает как сорное растение на полях и огородах, пастбищах, по обочинам шоссе и железных дорог и иным нарушенным местообитаниям; относится к группе ведущих сорняков, требующих специальных мер борьбы [1]. Однополые цветки бодяка собраны в корзинки диаметром 10-20 мм по пять и более на растении [2]. Корзинки располагаются на верхушке стебля в виде щитковидно-метельчатых соцветий, что облегчает сборы антофильных насекомых.

Полевые исследования велись с 11.07.2004 г. по 30.09.2004 г. на 6 стационарах, расположенных на территории Воложинского и Несвижского районов Минской области, территориально относящихся к западу центрального региона Беларуси.

Стационар № 1 - окрестности д. Калдыки Воложинского р-на, суходольный луг. Заросли бодяка перемежались небольшим числом дудника лекарственного (*Angelica archangelica* L.).