На правах рукописи

СТРЕЛЕЦКИЙ

Ростислав Александрович

Эколого-таксономические аспекты распространения фитогормональной активности среди дрожжей

Специальность 03.02.03 – микробиология

Специальность 03.02.08 – экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители:

Степанов Алексей Львович

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Демин Владимир Владимирович

кандидат биологических наук, ученое звание доцент, ведущий научный сотрудник кафедры географии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Меняйло Олег Владимирович

доктор биологических наук, профессор РАН, старший научный сотрудник лаборатории биогеохимических циклов в лесных экосистемах отдела дендроэкологии Института леса им. В.Н.Сукачева СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН

Семенова Татьяна Александровна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения экологических функций почв ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН» (ИПЭЭ РАН)

Ведущая организация:

ФГУП "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов"

Защита состоится 16 мая 2017 года в __:__ в аудитории М-2 на заседании диссертационного совета Д 501.002.13 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 12, МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения. С диссертацией можно ознакомиться на сайте факультета (http://soil.msu.ru/nauka/uchenyj-sovet) и в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова. Приглашаем вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании Диссертационного совета. Отзывы на автореферат просим направлять по адресу 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 12, МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения.

Автореферат разослан «____» _____ 2017 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета ……. Костина Н. В.

Актуальность работы

В настоящее время к дрожжам относят грибы, способные вегетативно размножаться в одноклеточной форме, независимо от того, имеют ли они мицелиальную фазу в жизненном цикле (Чернов, 2013). Дрожжи известны как продуценты ферментов и витаминов (Abbas, 2006), но некоторые аспекты их метаболизма и роли в природе практически не изучены. В том числе, это касается способности к синтезу фитогормонов, определяющих рост и развитие высших сосудистых растений.

Для бактерий и мицелиальных грибов собрано большое количество данных о фитогормональной активности, показано, что большинство представителей самых распространенных родов способно к синтезу тех или иных фитогормонов, многие виды способны к синтезу нескольких гормонов одновременно в физиологически значимых количествах (Архипова, Шендель, 2011; Karadeniz et al., 2006; Shokri, Emtiazi, 2010; Sutthinan et al., 2010; Pallai et al., 2012; Stirk et al., 2013). Многочисленные исследования доказывают, что бактерии и грибы, выделяя ауксины, цитокинины и гиббереллины, действительно могут стимулировать рост высших растений (Sachdev et al., 2009; Hamayun et al., 2011; Jiang et al., 2012). В настоящий момент показано, что способность синтезировать ауксин широко распространена среди аскомицетовых дрожжей (Jaiboon et al, 2016), хотя эти данные зачастую нуждаются в дополнительном подтверждении при помощи масс-спектрометрического анализа (Limtong, Koowadjanakul, 2012).

Более 30 лет назад было установлено, что цитокинины, в частности зеатин, присутствуют в автолизате пивных дрожжей (Staden, 1974; Jameson, Morris, 1989). Эти данные были получены при помощи иммунологических методов и хроматографии. Дальнейшее исследование способности дрожжей к синтезу цитокининов продолжено не было. Информация о способности дрожжей синтезировать гиббереллины отсутствует совсем.

Учитывая вышеизложенное, основной задачей диссертации стало проведение скрининга природных штаммов дрожжей на присутствие 3-

индолилуксусной кислоты (ауксина), цитокинина (зеатина) и гиббереллина ($ГК_3$) в культуральной жидкости.

Имеющиеся в современной научной литературе работы сосредоточены на исследовании отдельных организмов или групп, что не позволяет раскрыть экосистемные зависимости распространения фитогормональной активности. Нами ставилась цель не только показать широкое распространение данной способности на примере дрожжевых грибов, но также проверить наличие корреляции между фитогормональной активностью и важными с позиции экологии видовыми и штаммовыми особенностями дрожжей. Таким образом происходит расширение представления о роли дрожжевых грибов в естественных экосистемах, как неотъемлемого компонента микробоценозов.

Цель исследования

Оценить фитогормональную активность дрожжей из разных филогенетических и экологических групп и потенциал их влияния на рост растений.

Задачи исследования

1) Разработать методики количественного определения ауксина, гиббереллина и зеатина для работы с культуральной жидкостью микроорганизмов.
2) Провести в стандартных условиях скрининг штаммов дрожжей разных филогенетических и экологических групп на присутствие ауксина, зеатина и гиббереллина в культуральной жидкости.
3) Осуществить анализ полученных данных для выявления групп дрожжей наиболее активно синтезирующих фитогормоны.
4) Изучить динамику синтеза фитогормонов дрожжами и провести исследования фитогормональной активности в условиях микроаэрофильности и повышенной температуры.
5) Исследовать влияние дрожжей-производителей фитогормонов на рост и развитие проростков культурных растений.

Научная новизна

Впервые продемонстрировано широкое распространение способности синтезировать ауксин, зеатин и гиббереллин среди природных дрожжей. Проведен анализ зависимости фитогормональной активности дрожжей от их таксономического положения, некоторых физиологических, биохимических и экологических свойств штаммов. По средним значениям ауксиногенной активности аскомицеты значимо опережают базидиомицеты. В то же время способность к синтезу зеатина среди базидиомицетовых дрожжей встречается в два раза чаще. Установлено, что некоторые штаммы дрожжей синтезируют все три гормона-стимулятора одновременно, что предполагает их широкие возможности влияния на высшие растения. Фитогормональная активность коррелирует с климатогеографической приуроченностью штаммов: тропические штаммы наиболее активны в продуцировании ИУК, а штаммы арктико-альпийской зоны значимо активнее в синтезе зеатина и $ГК_3$. Обнаружен тренд в сторону большей интенсивности синтеза фитогормонов у штаммов, выделенных с поверхности высших растений. Показано, что синтез зеатина и ауксина идет пропорциональной росту культуры, а синтез гиббереллина, наоборот, начинается в стационарной фазе, как это характерно для вторичных метаболитов, в частности антибиотиков.

Практическая значимость

Обнаружение у дрожжей способности синтезировать комплекс фитогормонов позволяет рассматривать их как потенциальное биологическое удобрение. Показано, что дрожжи родов *Sporobolomyces, Taphrina, Metschnikowia, Aureobasidium* способны к синтезу одновременно трех гормонов стимуляторов – ауксина, зеатина и гиббереллиновой кислоты и оказывают множественные положительные эффекты на рост культурных растений. Высокая продукция ауксина зафиксирована у вида *Metschnikowia pulcherrima*, зеатина – у вида *Sporobolomyces roseus,* гиббереллина – у представителей рода *Taphrina*. Полученные в работе результаты включены в

курс лекций по биологии и биохимии почв, читаемых на кафедре биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова.

Выполнение работы было поддержано

грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований №16-34-00420 «Фитогормональная активность дрожжей» на 2016-2017 годы под руководством соискателя.

Апробация

Результаты были доложены на XVII Докучаевских молодежных чтениях (Санкт-Петербург, 2014), на 2 и 3 Международных микологических форумах (Москва, 2013, 2015), а также на международной молодежной конференции «Ломоносов» (Москва, 2016).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 работ: 3 статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК и 4 тезиса докладов по материалам российских и международных научных конференций.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 132 страницах, содержат 6 таблиц, 48 рисунков и 8 приложений. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), обсуждения результатов исследования (глава 3), заключения и выводов. Список литературы включает 111 источников.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность Чернову Ивану Юрьевичу, своему научному руководителю со студенческой скамьи, за неоценимую помощь и всестороннюю поддержку в выполнении исследовательской работы.

Автор благодарит Качалкина Алексея Владимировича, научного сотрудника кафедры биологии почв, за помощь в работе с коллекцией дрожжей и важные советы, касающиеся экспериментов и обработки данных.

Также автор благодарит Федотова Геннадия Николаевича, ведущего научного сотрудника кафедры географии почв, за помощь в проведении экспериментов по влиянию дрожжей на прорастание пшеницы и Завгороднюю Юлию Анатольевну, доцента кафедры химии почв, за ценные указания по вопросам аналитической химии.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования были использованы 147 штаммов дрожжей, относящиеся к 46 видам, большинство из которых было выделено из филлосферы, ризосферы, подстилки, почвы, энтомофильных цветков. Часть штаммов была выделена из таких субстратов, как ил, морская и пресная вода, водоросли. Идентификация штаммов была проведена на основании нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов рДНК (Глушакова и др., 2015; Глушакова и др., 2016). Выделение штаммов проводили в 2009-2015 годах, штаммы хранили в 15% растворе глицерина при -20ºС.

Для получения культуральной жидкости штаммы дрожжей в виде первоначального инокулята инкубировали во флаконах объемом 15 мл с 10 мл среды на шейкере в термостате при 20ºС в течение 4 суток, затем переносили 100 мкл наращенной культуры в микробиологические матрацы на 250 мл (Greiner) с 50 мл среды, и инкубировали при тех же условиях в течение 10 суток (Limtong, Koowadjanakul, 2012). Среду для культивирования дрожжей готовили из расчёта 6,7 г азотной основы (Fluka) и 5 г глюкозы на один литр воды (Kurtzman, Fell, 1998). Полученную культуральную жидкость переливали в центрифужные пробирки на 50 мл и отделяли от биомассы дрожжей на центрифуге R 5810 (Eppendorf) в течение 10 мин при 11500g. Удельную концентрацию фитогормонов рассчитывали на сырую биомассу дрожжей. В ряде случаев расчет проводился также на объем среды или сухую биомассу продуцентов.

Для исследования были взяты самые распространенные в природе соединения из трех групп гормонов-стимуляторов: из ауксинов – 3-

индолилуксусная кислота (ауксин или ИУК); из цитокининов – зеатин; из гиббереллинов – $ГК_3$ (гиббереллиновая кислота).

Определения ауксина методом ВЭЖХ-УФ. Пробоподготовка осуществлялась при помощи экстракции этилацетатом из подкисленной до pH~3 культуральной жидкости с последующим отгоном на роторном испарителе и переносом в хроматографические виалы.

Количественное определение ИУК проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies) с УФ-детектором (длина волны 222 нм). Разделение проводилось в градиенте ацетонитрил:вода с добавкой трифторуксусной кислоты с использованием предколонки C18 4x3,0 мм (Phenomenex) и аналитической колонки ВЭЖХ Диасфер 110-C18 5 мкм 4,0x250 мм (БиоХимМак).

Определение ИУК и $ГК_3$ методом ВЭЖХ-МС/МС. Для экстракции ИУК и $ГК_3$ подкисленную до pH~3 культуральную жидкость концентрировали и очищали на концентрирующих патронах C18 Cromabond 500 mg (Sorbtech), а также с помощью микроэкстракции этилацетатом с последующим концентрированием на роторном испарителе и переносом в хроматографические виалы. Количественное определение ИУК и $ГК_3$ проводили в градиенте ацетонитрил:вода с добавкой муравьиной кислоты на ВЭЖХ Agilent 1200 с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies). Источник ионизации – электроспрей (-). Ионы - прекурсоры: ауксин – m/z=174,06; $ГК_3$ – m/z=345,14. Колонка ВЭЖХ RP-8 3,5 мкм 4,6x200 мм (Perkin Elmer).

Определение зеатина методом ВЭЖХ-МС/МС. Для экстракции зеатина культуральную жидкость подкисляли до pH~3 муравьиной кислотой, очищали и концентрировали на катионите Dowex 50W×8,а затем на патроне C18 Cromabond 500 mg, после чего отгоняли экстракт на роторном испарителе и переносили в виалы. Количественное определение зеатина проводили на вышеупомянутом хроматографе. Источник ионизации –

электроспрей (+). Ион - прекурсор: m/z=220,12. Колонка ВЭЖХ RP-8 3,5мкм 4,6х200мм.

Влияние клеток дрожжей на скорость прорастания пшеницы. Эффективность стимуляции определяли по выделению углекислоты (Федотов, Федотова, 2015; Федотов и др., 2016). Для этого семена (5 г) обрабатывали препаратами, содержащими клетки дрожжей. Эффект оценивали как прибавку количества выделившегося CO_2 по отношению к контролю на стерильной воде.

Влияние культуральной жидкости дрожжей на рост проростков Lepidium sativum. Эксперимент проводили в чашках Петри (d=9см.), семена раскладывали по 10 штук на фильтровальную бумагу, смоченную культуральной жидкостью разведенной в минеральной смеси Кнопа (Журбицкий, 1968; Минеев и др., 2001). Эксперимент проводили в 5 повторностях. Чашки с семенами помещали в термостат на трое суток при температуре 25°С, после чего проводили измерение длины корешков и стеблей линейкой (Loper, Schroth, 1986). После этого проростки помещали в доведенные до постоянной массы бюксы (по вариантам эксперимента) и высушивали при 50°С в вакуумном шкафу в течение 3 суток. Затем бюксы взвешивали на аналитических весах.

Изучение динамики накопления гормонов в культуральной жидкости. В эксперименте было две повторности по 13 микробиологических матрацев в каждой. Матрацы снимали каждые 6 часов первые 2 суток и далее ежесуточно вплоть до достижения срока в 10 суток. Снятые матрацы с культуральной жидкостью помещали в морозильную камеру и хранили до начала экстракции фитогормонов при -18°С.

Микроаэрофильный тест. Нагретую до 90°С жидкую среду, состав которой описан выше, разливали в 50 мл центрифужные пробирки доверху и плотно закрывали крышку. Дав остыть, вносили наращенную культуру и снова плотно завинчивали крышку. Эксперимент в недостатке кислорода проводился 10 суток при 20°С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка и адаптация методик по определению фитогормонов в культуральной жидкости. Была разработана универсальная схема пробоподготовки культуральной жидкости, включающая очистку и концентрирование при помощи катионита Dowex 50W×8, патронов С-18 и жидкостной микроэкстракции. Предел количественного определения составляет 2 мкг/л для ауксина и 20 нг/л для зеатина и $ГК_3$.

Стабильность фитогормональной активности. Для типичных вторичных метаболитов, например, таких как антибиотики, характерно постепенное падение активности с возрастом культуры продуцента. Для проверки способности дрожжей поддерживать фитогормональную активность были взяты два штамма: КБП Y-6020 *Metschnikowia pulcherrima* – аскомицет и КБП Y-5472 *Sporobolomyces roseus* – базидиомицет. Культуры пересевали на среду ГПДА еженедельно в течение 3 месяцев (август-октябрь 2015 года) и после каждого пересева проверяли уровень фитогормональной активности. С количеством пересевов и временем концентрации фитогормонов практически не меняются, колебания активности не превышают 15%.

Скрининг штаммов дрожжей на присутствие фитогормонов в культуральной жидкости. Всего было исследовано 137 коллекционных штаммов на присутствие 3-индолуксусной кислоты в культуральной жидкости, 76 штаммов на присутствие зеатина и 50 штаммов на присутствие гиббереллиновой кислоты. 93% исследованных штаммов способны к синтезу ИУК. К синтезу зеатина способны 55% исследованных штаммов. Гиббереллин синтезируют 40% исследованных штаммов. Существенная разница по частоте встречаемости фитогормональной активности между отделами грибов наблюдается только для зеатина, среди базидиомицетов способность к его синтезу обнаруживается в 2 раза чаще, чем среди аскомицетов.

Средняя продукция ауксина дрожжами исследованной выборки составила 605,6 мкг/г. Наибольшие концентрации ИУК в культуральной жидкости были обнаружены у штаммов *Metschnikowia pulcherrima* (КБП Y-5623) – 8,0 мг/г, *Saccharomyces cerevisiae* (КБП Y-4511) – 5,1 мг/г сырой биомассы, что в пересчете на сухую клеточную массу составляет 60,9 и 40,6 мг/г, соответственно, а в пересчете на объем культуральной жидкости соответственно 53,3 и 33,7 мг/л. Данные виды относятся к аскомицетам и являются типичными обитателями растительных сахаристых субстратов. Средняя продукция зеатина дрожжами составила 88,5 нг/г влажной массы. Максимальные значения зафиксированы у штаммов 328v и КБП Y-5472 вида *Sporobolomyces roseus*, 789,7 и 881,21 нг/г влажной биомассы, что соответствует 7,9 и 8,9 мкг/г сухой клеточной биомассы соответственно или 5,3 и 5,9 мкг/л культуральной жидкости. *Sporobolomyces roseus* относится к баллистоспоровым видам, зачастую встречающимся на поверхности растений. Средняя продукция гиббереллиновой кислоты дрожжами составила 29,5 нг/г влажной биомассы. Максимальные значения зафиксированы у штаммов КБП Y-5623 и КБП Y-6020 вида *Metschnikowia pulcherrima*, 182,3 и 136,4 нг/г влажной биомассы, что соответствует 1,2 и 0,9 мкг/г сухой клеточной биомассы, соответственно или 1,8 и 1,3 мкг/л культуральной жидкости. По активности синтеза ауксина дрожжи не уступают бактериям и мицелиальным грибам.

Среди всех исследованных дрожжей 8 штаммов способны к синтезу всех трех гормонов одновременно. Среди них штамм *Aureobasidium pullulans,* данный вид относится к черным аскомицетовым дрожжам, и, по сути, представляет особую группу эпифитов – аскомицетов. Еще два штамма представлены родом *Sporobolomyces*, отличающимся способностью к формированию баллистоспор, указывающих на эпифитный образ жизни (Last, Price, 1969). Три из четырех исследованных представителей рода *Taphrin*а также активно синтезируют все 3 гормона. Мицелиальные грибы данного рода относятся к фитопатогенам, а исследуемые дрожжи

представляют анаморфную гаплоидную фазу развития, ведущую сапротрофный образ жизни (Inácio et al., 2004). Также способен продуцировать 3 фитогормона один из штаммов вида *Metschnikowia pulcherrima*.

Сравнение фитогормональной активности дрожжей разных филогенетических групп. Показано, что аскомицетовые дрожжи в среднем активнее синтезируют ауксин, чем базидиомицетовые (рис. 1).

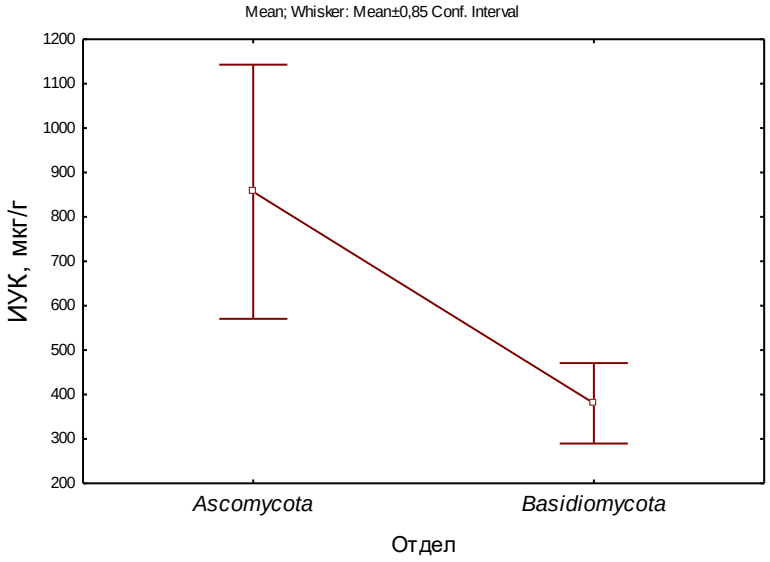

Рис. 1. Интенсивность синтеза ауксина аскомицетовыми и базидиомицетовыми дрожжами

Среди базидиомицетов наиболее активно образовывали ИУК дрожжи из подотдела *Ustilaginomycotina*, представленные в исследовании родом *Pseudozyma* - их фитогормональная активность составляла 450-1317 мкг/г (рис. 2). Стоит отметить, что многие дрожжевые представители *Ustilaginomycotina* тесно ассоциированы с растениями, являясь анаморфными филогенетическими линиями среди телеоморфных фитопатогенов (Begerow et al., 2014). Исследованные представители базидиомицетов других подотделов – *Agaricomycotina* и *Pucciniomycotina*, были в среднем в два раза менее активны, чем штаммы из *Ustilaginomycotina*.

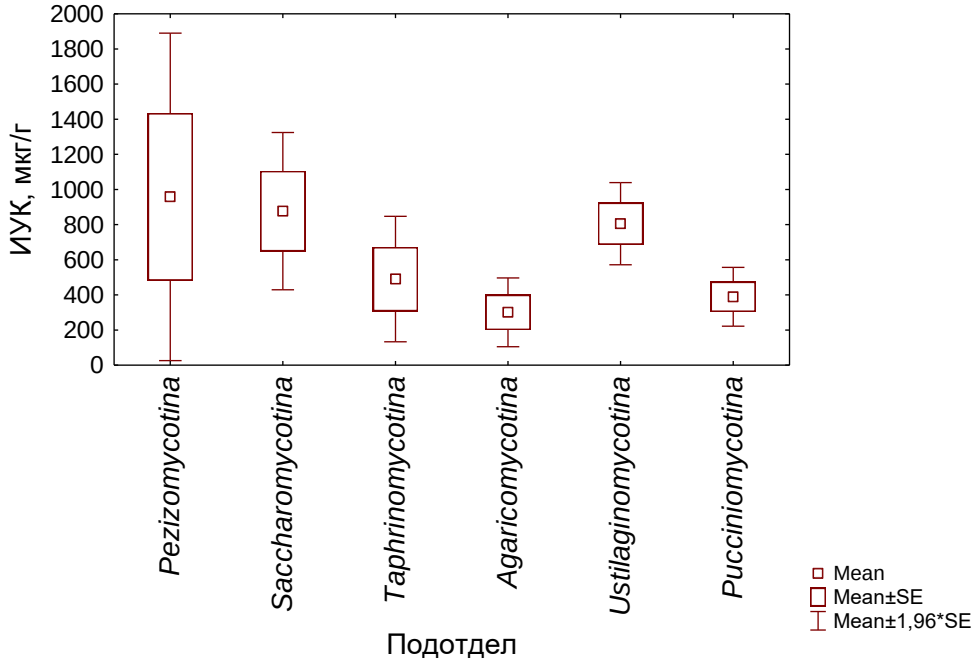

Рис. 2. Продукция ауксина представителями исследованных подотделов дрожжевых грибов

По синтезу зеатина все подотделы аскомицетовых и базидиомицетовых дрожжей оказались приблизительно равны, за исключением подотдела *Taphrinomycotina*, представленного в работе родом *Taphrina* (рис. 3).

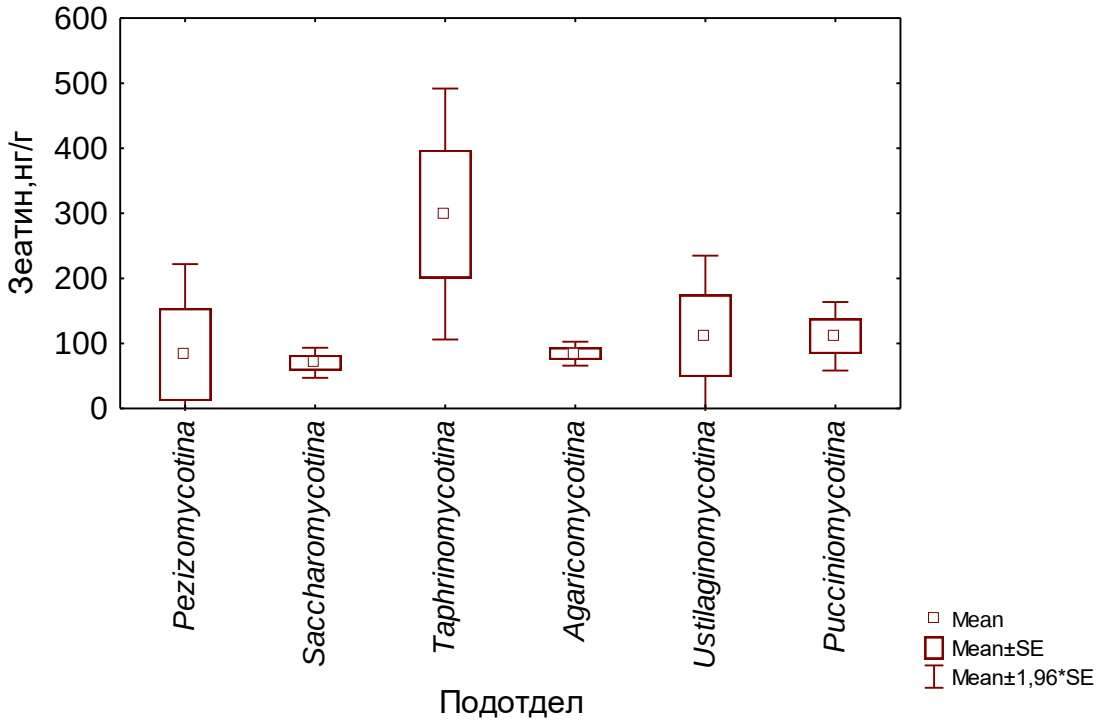

Рис. 3. Продукция зеатина представителями исследованных подотделов дрожжевых грибов

Известно, что дрожжи рода *Taphrina* часто выделяются со здоровых тканей растений, в отличие от мицелиальных грибов того же рода, которые обнаруживается на инфицированных растениях. Это позволяет предполагать, что дрожжевые анаморфные линии рода *Taphrina* потеряли паразитическую стадию и стали представителями здоровой растительной микрофлоры (Inacio et al., 2004).

Сравнение фитогормональной активности дрожжей по географическому признаку. Для систематизации мест выделения дрожжей нашей выборки мы воспользовались классификацией биомов Р. Уиттекера (1980). Анализ географической вариабельности показывает, что в среднем наиболее активно синтезируют ауксин штаммы, выделенные в тропической и теплой умеренной зонах. Штаммы из арктико-альпийской и холодной умеренной зон почти в три раза менее активны (рис. 4).

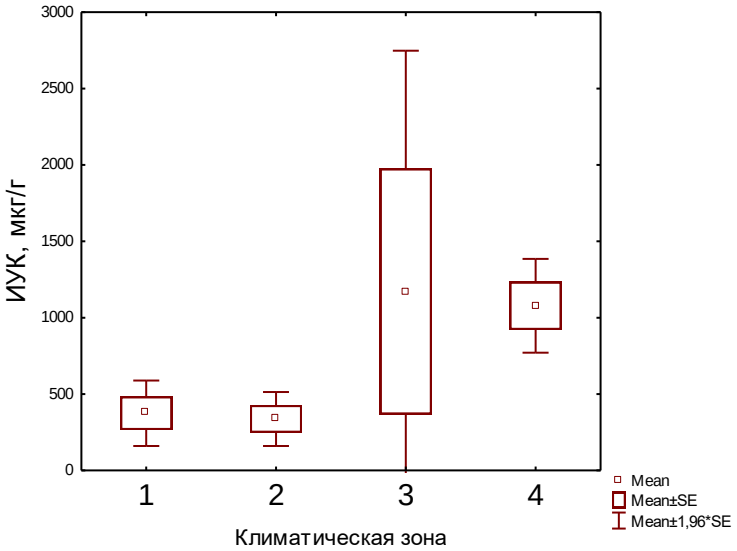

Рис. 4. Продукция ИУК дрожжами разных климатических зон (зона 1-арктико-альпийская; зона 2 – холодная умеренная; зона 3 – теплая умеренная; зона 4 – тропики)

Анализ географической вариабельности способности к синтезу зеатина и гиббереллина демонстрирует обратную картину – тропические штаммы в среднем в несколько раз менее активны, чем выделенные из трех других зон, причем наблюдаются различия между тропической и теплой умеренной зонами (рис. 5).

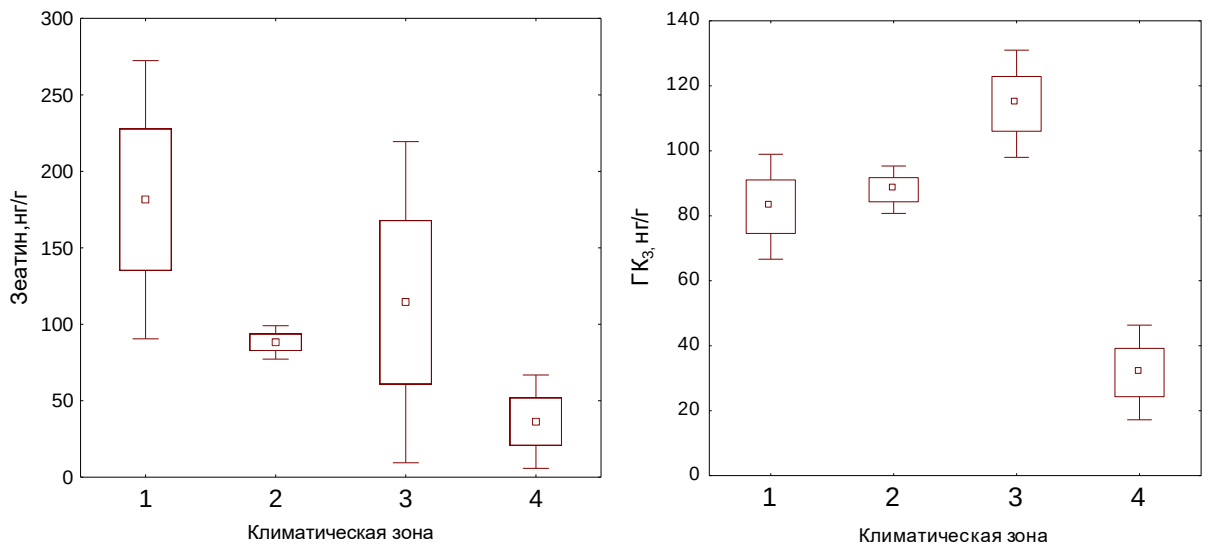

Рис. 5. Продукция зеатина и ГК$_3$ дрожжами разных климатических зон (зона 1-арктико-альпийская; зона 2 – холодная умеренная; зона 3 – теплая умеренная; зона 4 – тропики) (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

У штаммов арктико-альпийской зоны максимальная активность отмечается по зеатину. У штаммов теплой умеренной зоны – по гиббереллину, ненамного отличаясь от штаммов арктико-альпийской и холодной умеренной зоны.

Возможно, наблюдаемые географические закономерности отражают ход эволюции и формирования приспособлений, когда адаптация организмов из разных местообитаний идет в разном направлении.

В любом случае, дифференциация фитогормональной активности по географическому признаку демонстрирует важность данного явления для биоценозов и является доказательством наличия эволюционного отбора по этому признаку.

Фитогормональная активность дрожжей из различных типов природных субстратов. Субстратная зависимость фитогормональной активности по зеатину и ГК$_3$ имеет некоторую тенденцию к большей активности эпифитных штаммов по сравнению с выделенными из почвы и других субстратов. Для ауксина эта зависимость тоже выражена, но проявляется слабее. В любом случае, мы можем говорить только о тенденциях, а не о достоверных различиях.

Корреляция фитогормональной активности дрожжей с их физиологическими и биохимическими свойствами, указывающими на тесную связь с растениями. Анализ зависимости фитогормональной активности от пигментации культур показал, что по активности синтеза зеатина выделяются пигментированные аскомицеты, к которым относятся представители родов *Taphrina* и *Aureobasidium*. Пигментированные базидиомицеты не продемонстрировали повышенной фитогормональной активности.

Показано, что баллистоспоровые виды дрожжей в нашем исследовании более активны в производстве ауксина и сравнимы по этому показателю с аскомицетами. Также баллистоспоровые виды активнее синтезируют зеатин (рис. 6), в отношении синтеза гиббереллиновой кислоты они, наоборот, уступают аскомицетам и прочим базидиомицетам.

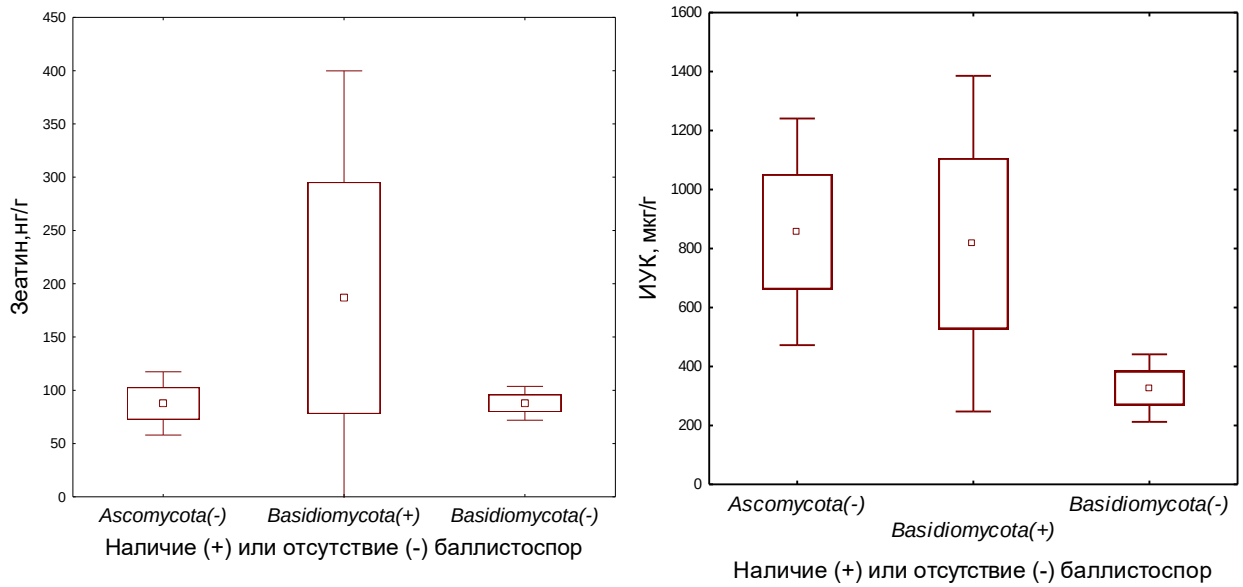

Рис. 6. Активность синтеза зеатина и ауксина баллистоспоровыми дрожжами (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

Наличие пектиназ также является признаком, указывающим на связь с растениями. По литературным данным, только у *Aureobasidium pullulans*, широко распространенного в филлосфере вида, пектиназная активность встречается часто (Buzzini, Martini, 2002). В нашем исследовании представлено 3 штамма данного вида, все они синтезируют ИУК и $ГК_3$, а два способны продуцировать зеатин. Два из трех, соответственно, синтезируют 3

фитогормона одновременно. По данным других исследователей *Aureobasidium pullulans* обладает, внутри исследуемых выборок, либо большей частотой встречаемости способности к синтезу ауксина (Limtong, Koowadjanakul, 2012), либо большей синтетической активностью по данному гормону (Ignatova et. al 2015; Fu et. al., 2016). Не исключено, что широкое распространение данного вида в филлосфере связано как с пектиназной так и с фитогормональной активностью.

Также была проанализирована зависимость фитогормональной активности от таких признаков как наличие амилаз, способность роста без витаминов, способность к брожению на глюкозе, сахарозе и галактозе. Но значимых различий обнаружено не было.

Влияние культур дрожжей на скорость прорастания пшеницы. Обнаружено, что живые клетки дрожжей, при совместном применении с автолизатом *Saccharomyces cerevisiae*, способны значительно ускорять прорастание семян пшеницы сорта «Эстер». Количество дрожжей в препаратах 2-4×10^7 КОЕ/мл, содержание дрожжевого автолизата – 75 мг/мл. Максимальный стимулирующий эффект по эмиссии CO_2 достигал 27,3 %.

Влияние культуральной жидкости дрожжей на рост проростков кресс салата. Отобранные для исследования штаммы КБП Y-6020 (*Metschnikowia pulcherrima*), КБП Y-5396 (*Aureobasidium pullulans*) и КБП Y-5419 (*Rhodotorula mucilaginosa*) проявляют высокую активность по всем трем гормонам и обозначаются как «первая группа» – наиболее важные (таб. 1). Оказалось, что культуральная жидкость данных штаммов вызывает сразу три эффекта: удлинение корня, удлинение стебля и увеличение общей массы проростков (рис. 7-8).

Корень по сравнению с контролем увеличивается до 2 раз, стебель до 1,5 раз. До 35% увеличивается масса проростков.

Остальные штаммы, отнесенные ко «второй группе» – способные синтезировать только некоторые гормоны (таб. 1), демонстрировали избирательный характер действия на различные органы растений.

Таблица 1

Фитогормональная активность исследуемых штаммов

штамм	ИУК	Зеатин	$ГК_3$	штамм	ИУК	Зеатин	$ГК_3$
	мкг/л	нг/л			мкг/л	нг/л	
КБП Y-6020 *M. pulcherrima*	18693,3	3201,3	906,7	КБП Y-4614 *S. podzolica*	22206,7	0,0	0,0
КБП Y-5396 *A. pullulans*	766,7	260,0	340,0	КБП Y-5132 *P. hubeiensis*	60,0	2386,7	0,0
КБП Y-5419 *R. mucilaginosa*	7593,3	150,0	53,3	КБП Y-5475 *C. trypodendroni*	5033,3	0,0	460,0

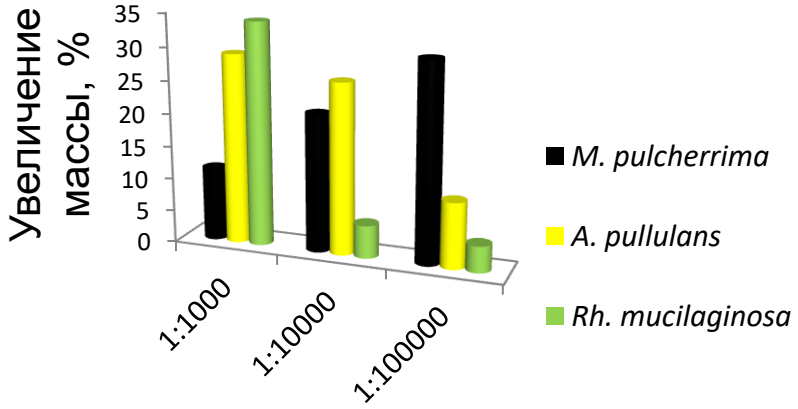

Рис.7. Изменение массы (%) проростков под влиянием культуральной жидкости дрожжей по отношению к контролю в разных разведениях

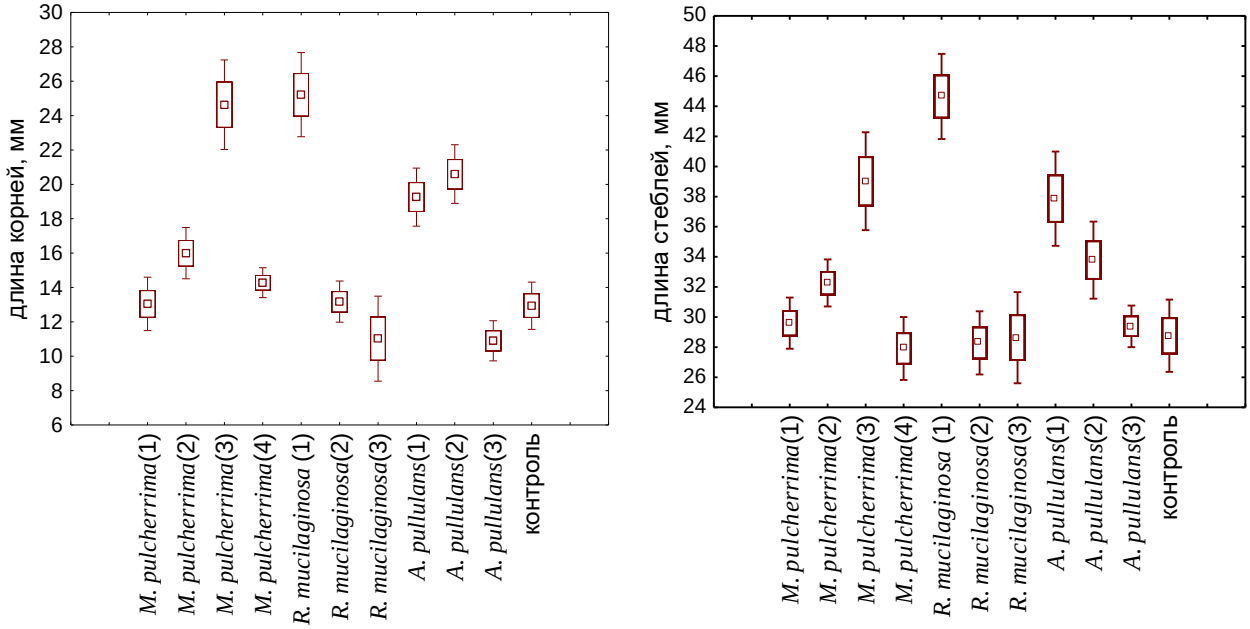

Рис. 8. Изменение длины (мм) корней и стеблей проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штаммов дрожжей в разведениях: (1) -1/1000, (2)-1/10000, (3)-1/100000, (4)-1/1000000 (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

Штамм КБП Y-4614 (*Saitozyma podzolica*) – высокоактивный производитель ауксина неспособный к синтезу зеатина и $ГК_3$. Его культуральная жидкость вызывает стимуляцию роста корней более чем в три раза в разведении 1:100000. При этом увеличения длины стебля не наблюдается. Максимальная прибавка к массе проростка - порядка 16% (рис. 9).

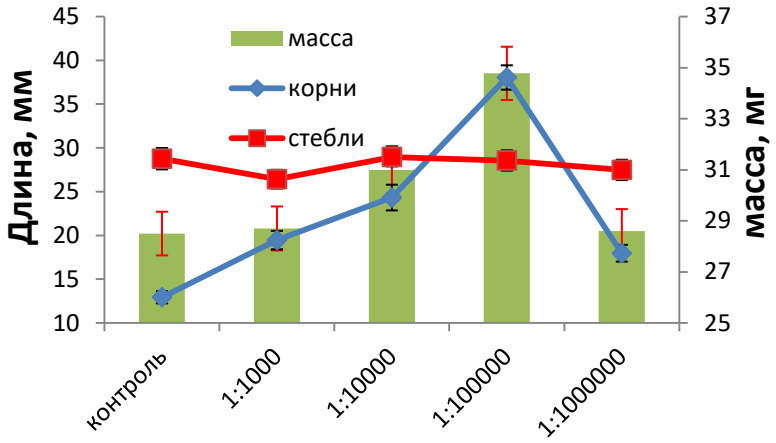

Рис. 9. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штамма КБП Y-4614 (S. podzolica) в разном разведении

Культуральная жидкость штамма КБП Y-5132 (*Pseudozyma hubeiensis*), активно синтезирующего зеатин, малоактивного производителя ИУК и не способного к синтезу $ГК_3$, стимулирует удлинение стебля в 1,5 раза в максимальном разведении, чего не наблюдается у штамма КБП Y-4614 (*S. podzolica*). Также наблюдается небольшое (на 20%) по сравнению со штаммом КБП Y-4614, удлинение корня в разведении 1:1000(рис. 10).

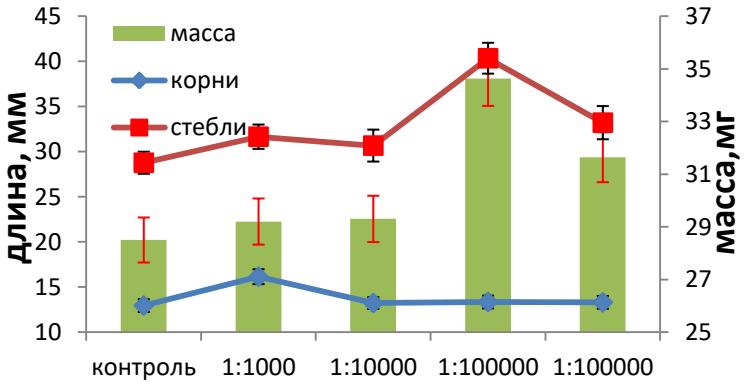

Рис.10 . Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штамма КБП Y-5132 (P. hubeiensis) в разном разведении.

Прибавка массы такая же, как у штамма КБП Y-4614 (*S. podzolica*). Вероятно, стимуляция длины стебля связана с синтезом зеатина.

Штамм КБП Y-5475 (*Candida trypodendroni*), активный производитель $ГК_3$ 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 КБП Y-4614 (*S. podzolica*), который также активно синтезирует ИУК и не продуцирует зеатин (рис. 11).

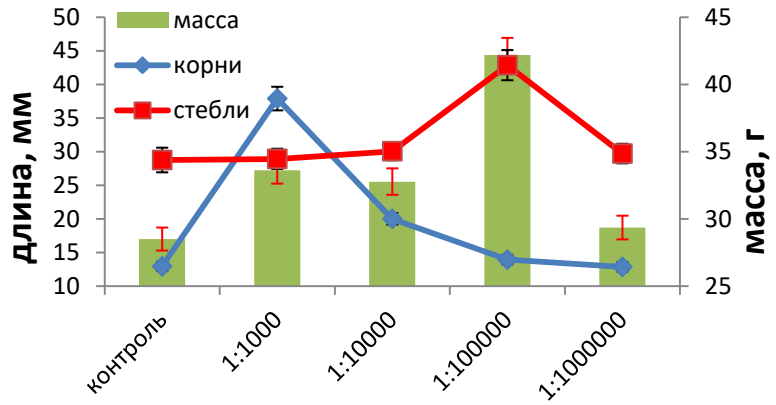

Рис. 11. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штамма КБП Y-5475 (*C. trypodendroni*) *в разном разведении*

При этом в разведении 1:100000 штамм *C. trypodendroni*, не влияя на длину корня, стимулирует удлинение стебля в 1,5 раза, т.е как в случае с КБП Y-5132 (*P. hubeiensis),* хотя *C. trypodendroni* не синтезирует зеатин. Возможно этот эффект связан с присутствием $ГК_3$ в культуральной жидкости (рис.11). В разведении также 1:100000 наблюдается увеличение массы проростков на 35%, как у штаммов «первой группы», что, возможно, также является следствием синтеза $ГК_3$.

Таким образом, стимуляция роста корня коррелирует с присутствием ауксина, а рост стебля - с зеатином и гиббереллином. Значительное увеличение (до 30%) массы проростка также, по-видимому, связано с

присутствием гиббереллина. Штаммы «первой группы» оказывают все эти эффекты.

Динамика накопления фитогормонов в культуральной жидкости дрожжей. Динамики накопления ауксина и зеатина очень похожи вещества накапливаются на стадии экспоненциального роста (рис.12). Динамика гиббереллина строго противоположна: он начинает

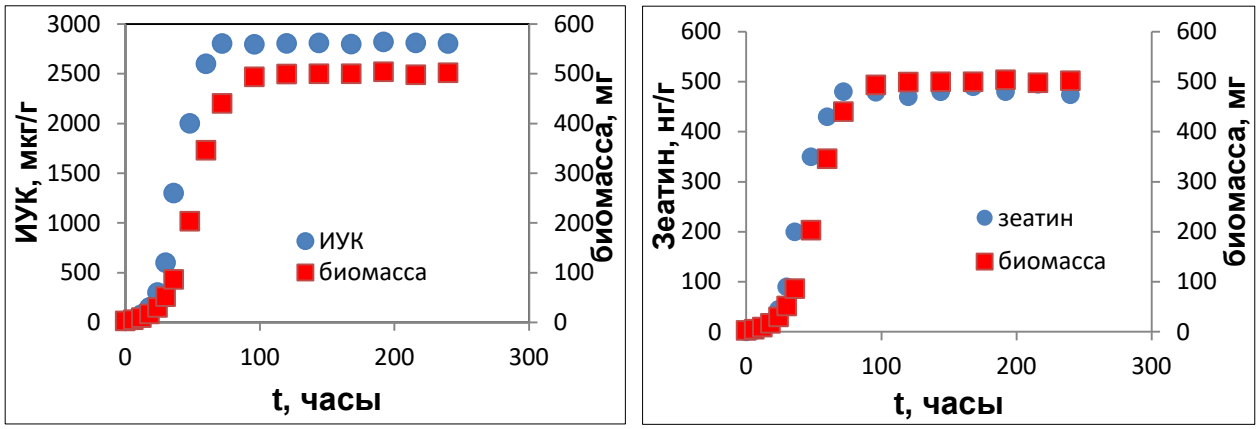

Рис. 12. Динамика роста культуры и накопления ауксина и зеатина в среде

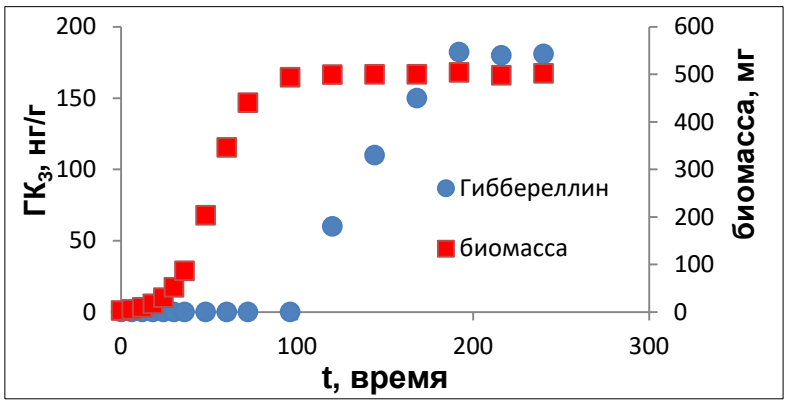

Рис. 13. Динамика роста культуры и накопления $ГК_3$ в среде

синтезироваться в стационарной фазе роста культуры, его концентрация возрастает линейно (рис. 13). Угол наклона кривой на стадии экспоненциального роста характеризует удельную скорость роста культуры. Хорошо видно, что стадия экспоненциального роста наблюдается в течение 36 часов, далее начинается фаза замедления, μ (удельная скорость роста) =0,0943 $ч^{-1}$ (рис. 14).

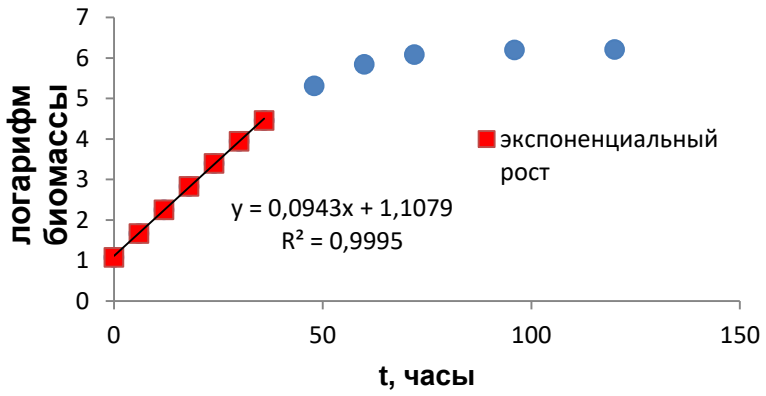

Рис. 14. Логарифмическое преобразование кривой роста.

Высокий коэффициент корреляции показывает, что в первые 1,5 суток рост можно считать экспоненциальным. Также мы видим полное отсутствие признаков наличия лаг-периода, что указывает на хорошо подобранные условия культивирования.

Исходя из того, что кривые накопления ауксина и зеатина в целом соответствуют кривой роста культуры, мы предполагаем, что образование этих фитогормонов прямо пропорционально росту и рассчитываем удельную скорость образования продукта из следующего уравнения (Перт, 1978): $p = p_0 + q_p\ N_0(e^{\mu t_1} - 1)/\mu$ где p – концентрация продукта, q_p – удельная скорость образования продукта. Для удобства приводим данное уравнение в линейный вид (p=p_0+qp×z), где p – продукт. Соответственно $z = \frac{N_0}{\mu}(e^{\mu t_1} - 1)$, где N_0 биомасса в начальный момент времени, который получена из уравнения экспоненциального роста культуры. Далее были рассчитаны значения z и построен график зависимости p от z, угол наклона которого характеризует q_p. Полученные высокие коэффициенты корреляции (r^2>0,99) между скоростью накопления биомассы (z) и концентрациями зеатина и ИУК доказывают наше предположение, что синтез этих фитогормонов прямо пропорционален приросту биомассы дрожжей в культуре.

Гиббереллин в среде начинает образовываться по истечении 4 суток, в то время как экспоненциальная фаза роста самой культуры дрожжей длится до 36 часов. Соответственно, динамика образования $ГК_3$ соответствует

динамике накопления вторичных метаболитов в культурах грибов (Егоров, 2004) (рис. 13).

Фитогормональная активность дрожжей в микроаэрофильных условиях. Дрожжи в микроаэрофильных условиях сохраняют способность синтезировать фитогормоны. Ограничением является только замедление роста и как следствие темпов синтеза у небродящих видов, к которым относится большинство базидиомицетов. Стоит отметить, что базидиомицеты зачастую обнаруживаются в тканях растений, а значит, нехватка кислорода не является для них критической.

Заключение

В результате проведенных исследований впервые удалось показать, что дрожжи из разных филогенетических и экологических групп способны к синтезу фитогормонов-стимуляторов, причем распространена эта способность довольно широко – 92% исследованных штаммов способны к синтезу ауксина, свыше 60% штаммов из выборки синтезировали зеатин, порядка 40% – гиббереллин. По средним значениям ауксиногенной активности аскомицеты значимо опережают базидиомицеты. В то же время способность к синтезу зеатина среди базидиомицетовых дрожжей встречалась в два раза чаще. Нам удалось установить, что некоторые штаммы дрожжей синтезируют все три гормона-стимулятора одновременно, что предполагает их широкие возможности влияния на высшие растения. В целом, фитогормональная активность оказалась штаммозависимым признаком, что подтверждается данными других авторов, исследовавших только ауксин.

Также удалось продемонстрировать, что дрожжи, являющиеся сапротрофными анаморфами из подотделов *Taphrinomycotina* и *Ustilaginomycotina*, в среднем более активно синтезируют гормоны, что, по всей видимости, является следствием их эпифитного образа жизни и родственности фитопатогенам. При этом сами дрожжи данной группы патогенами не являются.

Фитогормональная активность коррелирует с климатогеографической приуроченностью штаммов: тропические штаммы наиболее активны в продуцировании ИУК, а штаммы арктико-альпийской зоны значимо активнее в синтезе зеатина и $ГК_{3.}$ Предполагается, что это может быть связано с эволюционным отбором.

Выдвинуто предположение, что широкое распространение дрожжеподобных грибов *Aureobasidium pullulans* связано с их фитогормональной активностью. Данные дрожжи обладают сразу двумя важными для эпифитного образа жизни свойствами: пектиназной активностью и поливариантной способностью к синтезу растительных гормонов.

Что касается связи фитогормональной активности и экологической приуроченности дрожжей, то обнаружено, что существует тренд в сторону большей интенсивности синтеза у штаммов, выделенных с поверхности высших растений.

Эксперименты с семенами культурных растений показали, что дрожжи способны стимулировать прорастание и развитие проростков. Среди эффектов наблюдались: удлинение корня и стебля, а также увеличение сухой массы проростков. Причем, культуральная жидкость дрожжей с разным фитогормональным профилем оказывала различные эффекты.

Изучение динамики синтеза фитогормонов продемонстрировало, что синтез зеатина и ауксина идет пропорциональной росту культуры, а синтез гиббереллина, наоборот, начинается в стационарной фазе, как это характерно для вторичных метаболитов, в частности антибиотиков.

Чтобы смоделировать условия внутри растительных тканей, были проведены опыты в микроаэрофильных условиях и оказалось, что и аскомицетовые и базидиомицетовые дрожжи сохраняют фитогормональную активность при недостатке кислорода.

Выводы

1) Впервые показано широкое распространение фитогормональной активности среди дрожжей: в исследуемой выборке свыше 90% штаммов синтезируют ауксин, 60% зеатин, около 40% гиббереллин. Некоторые штаммы способны к синтезу 3 гормонов одновременно.
2) Аскомицетовые дрожжи активнее синтезируют ауксин, также обнаружена связь фитогормональной активности и принадлежности некоторых дрожжей к сапротрофным анаморфным линиям фитопатогенов.
3) В рамках исследованной выборки выделенные в тропиках штаммы интенсивнее синтезируют ауксин, а штаммы из северных регионов более активны в образовании зеатина и гиббереллина.
4) Дрожжи стимулируют рост и развитие проростков культурных растений. Штаммы, различающиеся фитогормональным профилем, оказывают влияние на разные органы растений.
5) Динамика синтеза зеатина и ауксина характеризуется накоплением продукта пропорционально биомассе, в то время как синтез гиббереллина начинается в стационарной фазе роста, как характерно для вторичных метаболитов.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи из журналов рекомендованных ВАК

1) Стрелецкий Р. А., Качалкин А. В., Глушакова А. М., Демин В.В., Чернов И.Ю. Определение 3-индолилуксусной кислоты у дрожжей с использованием масс-спектрометрического метода / *Микробиология*. — 2016. — Т. 85, № 6 — С. 713–721.

2) 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.

3) Стрелецкий Р. А., Качалкин А. В., Федотов Г. Н. Влияние дрожжей-продуцентов фитогормонов на развитие проростков *Lepidium sativum* / *Современные проблемы науки и образования*. — 2017. — № 1. — С. 1–9.

Тезисы и материалы конференций

1) Стрелецкий Р. А. Фитогормональная активность дрожжевых грибов/Материалы XVII Докучаевских молодежных чтений "Новые вехи в развитии почвоведения: современные технологии как средства познания". – Москва, 2014. – С. 186-187.

2) Стрелецкий Р. А., Качалкин А. В. Географическая дифференциация штаммов *Rhodotorula mucilaginosa* по продукции 3-индолилуксусной кислоты / БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. — Пущино, 2014. — С. 224–225.

3) Стрелецкий Р. А. Фитогормональная активность дрожжей // Современная микология в России. Материалы III Международного микологического форума. — Т. 4. — Национальная академия микологии, Москва, 2015. — С. 90–92.

4) Стрелецкий Р. А. Дрожжи как производители растительных гормонов // Материалы Международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2016, серия Почвоведение. — МАКС Пресс Москва, 2016. — С. 37–38.