

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ФТАЛАТОВ В КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТАХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА, ИНОКУЛИРОВАННЫХ *RHIZOBIUM* *LEGUMINOSARUM* BV. *VICEAE* И *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI* ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Л.Е. Макарова, А.С. Мориц, Н.А. Соколова, И.С. Нестеркина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, makarova@sifibr.irk.ru

Аннотация. Методом ГХ-МС-анализа исследовали состав фталатов в корневых экссудатах проростков гороха, инокулированных бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, росших при температурах 21 и 9 °С на водной среде, содержащей набор необходимых для роста микроэлементов. Результаты указывают на влияние температуры среды и на возможность изменений в составе фталатов в ризосфере гороха под влиянием ризобий.

Ключевые слова: корневые экссудаты, температура, фталаты, *Rhizobium*, *Pseudomonas*
DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-488-491

В экссудатах бобового растения среди многообразия представленных в них ароматических соединений имеются компоненты не только стимулирующие, но и подавляющие рост и развитие микрофлоры и даже некоторых высших растений. В число таких компонентов у бобовых растений наряду с фитоалексинами изофлавоноидного происхождения, по-видимому, входят N-фенил-2-нафтиламин и фталаты, обнаруженные нами ранее у этих растительных культур [Макарова et al., 2012, 2016]. Судя по появившимся в последние годы сообщениям [Семенов и др., 2016], фталаты присутствуют в тканях более широкого круга представителей растительного мира. Во внешнюю сферу фталаты могут секретировать и многие виды бактерий, способные катаболизировать полициклические ароматические соединения по фталатному пути [Keyser et al., 1976]. Некоторые виды сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты могут подавлять рост определенных видов бактерий [Al-Bari et al., 2006], то есть участвовать в селекции состава микробиоты в ризосфере растения.

Ранее нами сообщалось [Макарова и др., 2016] о способности *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* подвергать деструкции с образованием фталатов N-фенил-2-нафтиламин, присутствие которого в корневых экссудатах растения гороха, как отмечено выше, установлено нами ранее. Деструктирующая активность перечисленных видов бактерий в отношении N-фенил-2-нафтиламина, как мы полагаем, может способствовать изменениям в составе, и, не исключено, что и в общем количестве фталатов в ризосфере их растения-хозяина. Исходя из сказанного, мы поставили цель – сравнить состав фталатов в экссудатах растений гороха после появления в его ризосфере указанных видов бактерий, один из которых является мутуалистом, другой патогеном для растений гороха, и выяснить при этом влияние температуры среды (21 и 9 °С). Контролем в экспериментах служили неинокулированные проростки, также росшие, соответственно, при 21 и 9 °С.

Для исследований использовали 2-хсуточные этилированные проростки гороха сорта Торсдаг, полученные в термостате с температурой 21 °С. Бактерии вносили в водную среду одновременно с помещением в нее корней проростков гороха. Через 1 сут экспозиции при постоянно действующей температуре (21 или 9 °С), освещении (81 мкМ⁻²·сек⁻¹) и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) фенольные соединения экстрагировали при помощи этилацетата из водной среды, куда они секретировались из корневых

клеток проростков. Полученные экстракты сгущали до минимального объема, соединения в них подвергали силилированию, и затем состав присутствующих в экстрактах соединений исследовали методом ГХ-МС - анализа. Следует заметить, что фталаты и N-фенил-2-нафтиламин не образовывали связи с атомами кремния силилирующих агентов, силилированию подвергалась только *о*-фталевая кислота, которая была представлена на хроматограмме в виде очень маленького пика. Зато в составе экстрактов выявлен ряд свободных жирных кислот и их эфиров, которые, по-видимому, легко подвергались силилированию, а пики, к ним относящиеся, доминировали по площади и высоте над фенольными соединениями в составе исследуемых экстрактов.

Полученные нами результаты исследования состава фталатов представлены в таблице. Данные показывают, что вне зависимости от температурных условий и воздействующего на растения гороха вида бактерий в его ризосфере неизменно присутствующими компонентами были дибутилфталат и диизооктилфталат. Но температура, по-видимому, определяет синтез в клетках корня гетерорадикального бутил - тетрадецил фталата и диизононилфталата. Первый из них в среде роста корней присутствовал только в условиях действия температуры 21 °С, второй обнаружен при 9 °С. Очевидно, это может быть прямым свидетельством изменений в биосинтезе сложноэфирных соединений *о*-фталевой кислоты в зависимости от температуры среды. Характерно, что появление двух перечисленных выше фталатов в составе экссудатов не было связано с инокуляцией изучаемыми видами бактерий.

Таблица.

Состав фталатов в ризосфере проростков гороха, росших при 21 и 9 °С

Соединения, обнаруженные в экстрактах после их обработки силилирующими реагентами (ГМДС и БСА)	Показатели ГХ- МС-анализа		Контроль		Инокуляция <i>Rhizobium</i>		Инокуляция <i>Pseudomonas</i>	
	t _{уд.} , мин	% вероят- ности	21 °С	9 °С	21 °С	9 °С	21 °С	9 °С
<i>о</i> -Фталевая к-та, бис- триметилсилиловый эфир	16,41	7,2%	-	-	-	+	-	-
Бутил тетрадециловый эфир <i>о</i> -фталевой кислоты	19,70	16,6%	+	-	+	+	+	-
Дибутилфталат	21,56	25%	+	+	+	+	+	+
Диизооктилфталат	31,49	60%	+	+	+	+	+	+
Диизононилфталат	34,72	73,8%	-	+	-	+	-	+

Обозначения в таблице: t_{уд.} – время выхода пика; % вероятности – степень вероятности для идентифицируемого соединения; «+» и «-» - соответственно отмечено наличие или отсутствие вещества.

При сравнении с растениями контроля замечено, что влияние бактерий *Pseudomonas* на состав фталатов в ризосфере проростков гороха при обоих температурных режимах отсутствует. При инокуляции ризобиями состав фталатов в ризосфере контроля и инокулированных проростков при оптимальной температуре был одинаков, однако пониженная температура способствовала появлению в среде роста инокулированных корней бутил-тетрадецил фталата и с низкой вероятностью - *о*-фталевой кислоты (таблица). При изучении деструктирующей активности обоих видов бактерий в отношении N-фенил-2-нафтиламина (напомним, он является компонентом корневых экссудатов бобовых растений) мы не находили бутил-тетрадецил фталат в среде их роста. Однако данное соединение в относительно небольшом количестве было обнаружено в культуральной среде ризобий при замене N-фенил-2-нафтиламина на

дибутилфталат. Поэтому можно предположить, что в условиях пониженной температуры появление при инокуляции ризобиями в ризосфере проростков гороха бутил-тетрадецил фталата обусловлено усилением активности этих бактерий в преобразовании до бутил-тетрадецил фталата дибутилфталата, который выделяется в экссудаты корневыми клетками этого растения в довольно большом количестве [Makarova, Dudareva, 2016].

Итак, полученные нами данные говорят о том, что синтез некоторых видов фталатов в корневых клетках растения, которые секретируются ими во внешнюю среду, зависит от температуры среды. Вклад в изменение содержания фталатов в ризосфере растения могут вносить и виды бактерий, которые отличаются способностью подвергать катаболизму полициклические соединения по фталатному пути. А при этом изменения в составе фталатов при участии бактерий, вероятно, обуславливаются их способностью заменять, или, возможно, преобразовывать путем изменения длины углеводородной цепочки и образования разветвленных углеводородных структур у спиртовых группировок, которые связаны с *о*-фталевой кислотой эфирными связями по ее карбоксильным группам. Исходя из полученных нами данных, мы можем отметить разницу между двумя симбионтами гороха – *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (мутуалист) и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (антагонист) - по их влиянию на состав фталатов в ризосфере своего растения-хозяина при пониженной температуре. Эти данные показывают, что, несмотря на то, что оба вида бактерий одинаково способны катаболизировать нафталиновые группировки N-фенил-2-нафтиламина до *о*-фталевой кислоты с последующей образованием ее фталатов, влияние первого вида сказывается на компонентном составе фталатов, а второй вид не вызвал изменений в составе последних. Причем, это влияние проявилось в условиях пониженной температуры.

Литература

Макарова Л.Е., Мориц А.С., Васильева Г.Г. Влияние бактерий мутуалистического и антагонистического типа взаимодействия на содержание негативных аллелопатических соединений в составе корневых экссудатов растений гороха // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 12–15 сентября 2016 г.). – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016. – С. 127–128.

Семенов А.А., Еникеев А.Г., Снеткова Л.В., Пермиков А.В., Соколова Н.А., Дударева Л.В. Сложные эфиры орто-фталевой кислоты из культуры *Aconitum baicalense* Turcz. ex Rapaics 1907 // Докл. Академии наук. – 2016. – Т. 471. – № 3. – С. 366–367.

Al-Bari M.A.A., Sayeed M.A., Rahman M.S., Mossadik M.A. Characterization and Antimicrobial Activities of a Phthalic Acid derivative Produced by *Streptomyces bangladeshensis* A Novel Species Collected in Bangladesh // Research Journal of Medicine and Medical Sciences. – 2006. – V. 1 (2). – P. 77–81.

Keyser P., Pujar B.G., Eaton R.W., Ribbons D.W. Biodegradation of the Phthalates and Their Esters by Bacteria // Environmental Health Perspectives. – 1976. – V. 18. – P. 153–166.

Makarova L.E., Smirnov V.I., Klyba L.V., Petrova I.G., Dudareva L.V. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2012. – V. 48. – P. 355–362.

Makarova L.E., Dudareva L.V., Petrova I.G., Vasil'eva G.G. Secretion of phenolic compounds into root exudates of pea seedlings upon inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* or *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* // Applied biochemistry and Microbiology. – 2016. – V. 52. – No. 2. – P. 205–209.

STUDY OF THE PHTHALATES COMPOSITION IN THE PEA SEEDLINGS ROOT EXUDATES INOCULATED WITH *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICEAE* AND *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI* AT DIFFERENT TEMPERATURES

L.E. Makarova, A.S. Morits, N.A. Sokolova, I.S. Nesterkina

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, makarova@sifibr.irk.ru

Abstract. The composition of phthalates in root exudates of pea seedlings inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* and *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, grown at temperatures of 21 and 9 °C on an aqueous medium containing a set of microelements necessary for growth was studied by GC-MS analysis. The results indicate the effect of environmental temperature and the possibility of changes in the composition of phthalates in the pea plant rhizosphere under the influence by rhizobia.

Keywords: *root exudates, temperature, phthalates, Rhizobium, Pseudomonas*