

Л.О. Білявська¹, О.В. Надкернична², О.Б. Копилова²

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, 03143, Україна

² Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

БІОСИНТЕЗ ФІТОГОРМОНІВ ГРУНТОВИМИ ГРИБАМИ *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

Мета. Дослідити ріст-регулюючі активності культуральних рідин ґрунтових грибів роду *Cladosporium* та біосинтез ними фітогормональних речовин. **Методи.** Визначення ріст-регулюючої активності культуральної рідини грибів *C. cladosporioides* 525 та *C. cladosporioides* 495 проводили методом специфічного біотестування, вміст фітогормонів (ауксинів, цитокінінів та абсцизової кислоти) у супернатанті культуральних рідин – методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії. **Результати.** Показано, що ґрунтові гриби *Cladosporium cladosporioides* здатні до синтезу фітогормональних речовин стимулюючої дії: ауксинів, цитокінінів та гіберелінів. У результаті скринінгу відібрано два перспективних штами *C. cladosporioides* 525 та *C. cladosporioides* 495. Штам *C. cladosporioides* 495 значно переважав *C. cladosporioides* 525 як за сумарним рівнем синтезу ауксинів, так і за здатністю синтезувати фізіологічно активний для рослин ауксин – індол-3-оцтову кислоту. Серед цитокінінів, що синтезуються грибами, виявлено зеатин, зеатинрибозид, ізопентиніладенін та ізопентиніладенозин, загальний вміст яких майже не відрізнявся. Обидва штами грибів були здатні до утворення незначної кількості гіберелової кислоти. **Висновок.** Здатність досліджуваних штамів продукувати фітогормональні речовини ріст-стимулювальної дії дає змогу вважати їх перспективними для використання в сільськогосподарському виробництві.

Ключові слова: *Cladosporium cladosporioides*, фітогормони, ауксини, цитокініни, гібереліни

Здатність продукувати фітогормональні речовини притаманна як рослинам, так і мікроорганізмам, і на сьогодні фітогормони розглядаються як специфічні посередники в комунікаціях між рослиною-живителем та асоційованою з нею мікрофлорою [1, 2].

Відомо, що регуляція росту рослин здійснюється, в основному, декількома класами фітогормонів: ауксинами, цитокінінами, гіберелінами, абсцизовою кислотою, етиленом, брасинами (брасиностероїдами) та жасмоновою кислотою. Умовно ауксини, гібереліни, цитокініни і частково брасини можна віднести до речовин стимулюючої дії, тоді як абсцизову кислоту, етилен і жасмонову кислоту – до інгібіторів.

Відомі штами мікроорганізмів – активних продуцентів фітогормональних речовин [3-5]. Застосування мікробних метаболітів з фітогормональною активністю є перспективним напрямом у сільськогосподарському виробництві, що дає можливість регулювати процеси росту та розвитку сільськогосподарських культур, підвищувати їх стійкість до патогенних організмів та стресових чинників, отримувати продукцію високої якос-

ті. Фітогормональні речовини, отримані шляхом мікробіологічного синтезу, мають низку переваг у порівнянні із синтетичними регуляторами росту, одержаними хімічними способами. Мікроорганізми-продуценти фітогормональних речовин характеризуються поліфункціональною дією на рослини, що дає високий біологічний ефект. Крім того, застосування мікроорганізмів та їх метаболітів не порушує природні екологічні зв'язки в агроєкосистемах та сприяє збереженню біологічного різноманіття і навколишнього середовища в благополучному стані. Важливо також, що фітогормональні речовини, одержані в результаті мікробного синтезу є значно дешевшими за такі ж, отримані хімічним шляхом.

Активними продуцентами фітогормональних речовин стимулюючої дії є гриби [6]. Пошук штамів грибів-продуцентів фітогормонів, здатних позитивно впливати на ріст і розвиток рослин, та їх використання як потенційних агентів біопрепаратів заслуговує на увагу.

Метою нашої роботи було дослідити ріст-стимулювальні активності культуральних рідин ґрунтових грибів роду *Cladosporium* та біосинтез ними фітогормональних речовин.

Матеріали і методи. У роботі було використано два штами грибів роду *Cladosporium* виду *C. cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries. Штам *C. cladosporioides* 525 виділено з ризосферного ґрунту пшениці ярої сорту Рання 93, *C. cladosporioides* 495 виділено з коренів люпину білого сорту Либідь. Ідентифікація представників роду *Cladosporium* була проведена за морфолого-культуральними ознаками та з використанням молекулярно-генетичних досліджень [4-6].

Гриби культивували поверхнево на рідкому середовищі Ролена-Тома з додаванням гліцерину: сахароза – 60 г, виннокислий амоній – 2 г, гліцерин – 1 г, $MgSO_4$ – 0,2 г, K_2SO_4 – 0,2 г, розчин мікроелементів – 1 см³ ($MgSO_4$ – 8 мг, $CuSO_4$ – 40 мг, $ZnSO_4$ – 880 мг, $CoSO_4$ – 10 мг, $FeSO_4$ – 100 мг, H_3BO_3 – 6 мг, $CaCl_2$ – 100 мг), вода – 1 дм³, рН 5,0-5,5, за температури 26-27°C упродовж 9 діб. Культуральну рідину відфільтровували і пропускали крізь мембранні фільтри.

Проводили специфічне біотестування ріст-регулюючої активності культуральної рідини грибів *C. cladosporioides* 525 та *C. cladosporioides* 495. Ауксинову активність вивчали на живцях квасолі сорту Лапата. Зміни кількості коренів на одному живці виражали у відсотках до відповідної кількості у контрольному варіанті. Як позитивний контроль використовували розчин індоліл -3-оцтової кислоти в концентрації 10⁻⁵ М.

Цитокінінову активність вивчали на ізольованих сім'ядолях огірка сорту Джерело. Зміни маси сім'ядолі виражали у відсотках до відповідної маси у контрольному варіанті. Як позитивний контроль використовували розчин кінетину в концентрації 10⁻⁵ М.

Гіберелінову активність вивчали на відрізках стебла 6-денних проростків кукурудзи. Зміни приросту відрізків стебла виражали у відсотках до відповідної довжини у контрольному варіанті. Крім того, визначення гіберелінової активності проводили за використання гіпокотилів паростків огірка сорту Роднічок. Довжину гіпокотилей в контрольному варіанті (розчин гіберелінової кислоти в концентрації 10⁻⁵ М) порівнювали з відповідним показником у досліді. Для визначення вмісту фітогормонів

(ауксинів, цитокінінів та абсцизової кислоти) у супернатанті культуральних рідин ґрунтових сапротрофних мікроміцетів застосовували метод кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [7, 8]. Культуральні рідини *C. cladosporioides* 525 та *C. cladosporioides* 495 центрифугували за 3000 об./хв., відбирали супернатанти та упарювали під вакуумом за 40-45 °С. Сухий залишок перерозчиняли в 1,5-3 мл етанолу, переносили в епіндорфи, залишали на добу за -24 °С для виморожування полісахаридів, надосад відбирали та знову центрифугували.

Попереднє очищення і концентрування фітогормонів проводили на пластинках із силікагелем марки «Silufol UV₂₅₄» («Chemapol», Чехія) у суміші розчинників, застосованих послідовно: хлороформ, 12,5%-ний аміак, етилацетат:оцтова кислота (20:1). Очищені таким чином екстракти розділяли на пластинках з оксидом кремнію (фірми «Merck») для індольних сполук та на пластинках з оксидом алюмінію для цитокінінів (фірми «Merck»). Кількісне детектування фітогормонів здійснювали за допомогою скануючого спектроденситометра «Sorbfі» (Росія).

Попереднє очищення екстрактів для кількісного визначення вмісту гіберелінів проводили за методикою Муромцева та співавт. [9] з використанням етилацетату і цитратно-фосфатної буферної системи (рН 2,5 і 7,0). Кількісне визначення вмісту гіберелінів у пробі проводили спектрофотометричним методом. Лінійна залежність між показником екстинції та вмістом гіберелінів спостерігалась від 10 до 200 нг гібереліну на 1 мл.

Біомасу грибів визначали гравіметричним методом і виражали у г в перерахунку на 1 л культуральної рідини [10].

Статистичну обробку отриманих даних виконували з використанням дисперсійного аналізу.

Результати. Гриби роду *Cladosporium*, що зберігаються в колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, перевіряли на здатність продукувати ріст-стимулювальні речовини за використання біотестів, які ґрунтовані на ростових ефектах речовин фітогормональної природи. В результаті було відібрано два перспективних штами *C. cladosporioides* 525 та *C. cladosporioides* 495. Як свідчать одержані результати (табл. 1 – 3), обидва штами виявляють ауксинову, цитокінінову та гіберелінову активності. Втім, ауксинова та гіберелінова активності *C. cladosporioides* 495 значно вище, ніж *C. cladosporioides* 525. Так, приріст кількості коренів на живцях квасолі за

Таблиця 1

Ауксинова активність супернатантів культуральних рідин грибів *C. cladosporioides* (біотест - живці квасолі)

Варіант досліджу	Кількість коренів на одному живці	
	шт. ($\bar{X} + S\bar{x}$)	% змін відносно контролю
Вода (контроль)	9,5 ± 1,12	–
Індоліл-3-оцтова кислота, 10 ⁻⁵ М	10,8 ± 1,23	13,7
Культуральна рідина <i>C. cladosporioides</i> 525, розбавлена в співвідношенні 1:1000	10,2 ± 1,37	7,4
Культуральна рідина <i>C. cladosporioides</i> 495, розбавлена в співвідношенні 1:1000	17,0 ± 1,20	78,9

Примітка: \bar{X} – середня арифметична, $S\bar{x}$ – помилка вибіркової середньої

використання *C. cladosporioides* 495 складав 78,9% відносно контролю, за використання *C. cladosporioides* 525 тільки 7,4% (табл. 2). Приріст відрізків стебел 6-денних проростків кукурудзи за використання *C. cladosporioides* 495 склав 17,3% відносно контролю, за використання *C. cladosporioides* 525 – 5,0% (табл. 3). Цитокінінова активність *C. cladosporioides* 525 та

Таблиця 2
Цитокінінова активність супернатантів культуральних рідин грибів *C. cladosporioides* (біотест – ізольовані сім'ядолі огірка сорту Джерело)

Варіант досліджу	Приріст маси сім'ядолі, мг ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)	% змін відносно контролю
Вода (контроль)	48,0 ± 3,25	–
Кінетин, 10 ⁻⁵ М	164,0 ± 10,32	241,7
Культуральна рідина <i>C. cladosporioides</i> 525, розбавлена водою у співвідношенні 1:1000	65,1 ± 2,97	35,6
Культуральна рідина <i>C. cladosporioides</i> 495, розбавлена водою у співвідношенні 1:1000	66,4 ± 2,25	38,3

Таблиця 3
Гіберелінова активність супернатантів культуральних рідин грибів *C. cladosporioides* (біотест - відрізки стебла 6-денних проростків кукурудзи сорту Рання золота 401)

Варіант досліджу	Приріст відрізків стебла, мм ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)	% змін відносно контролю
Вода (контроль)	25,9 ± 1,82	–
Гіберелова кислота ГК ₃ , 10 ⁻⁵ М	27,6 ± 1,76	6,5
Культуральна рідина <i>C. cladosporioides</i> 525, розбавлена водою у співвідношенні 1:1000	27,2 ± 1,46	5,0
Культуральна рідина <i>C. cladosporioides</i> 495, розбавлена водою у співвідношенні 1:1000	30,4 ± 1,34	17,3

Таблиця 4
Питомий рівень біосинтезу фітогормональних речовин грибами *C. cladosporioides*

Фітогормони	Вміст фітогормонів у супернатанті культуральної рідини, мкг/г сухої біомаси	
	<i>C. cladosporioides</i> 525	<i>C. cladosporioides</i> 495
Ауксини, в тому числі:	10,69 ± 0,166	195,71 ± 0,697
індол-3-оцтова кислота	2,12 ± 0,074	37,69 ± 0,307
індол-3-масляна кислота	3,28 ± 0,089	57,91 ± 0,379
індол-3-оцтової кислоти гідрозид	3,85 ± 0,099	20,04 ± 0,222
індол-3-карбоксалдегід	0	26,29 ± 0,256
індол-3-карбінол	0	30,34 ± 0,276
індол-3-карбоксілова кислота	1,44 ± 0,059	23,44 ± 0,242
Цитокініни, в тому числі:	26,96 ± 0,262	28,95 ± 0,269
зеатин	6,20 ± 0,126	12,32 ± 0,175
зеатинрибозид	6,03 ± 0,124	5,41 ± 0,117
ізопентиніладенін	4,43 ± 0,106	5,49 ± 0,117
ізопентиніладенозин	10,30 ± 0,163	5,73 ± 0,119
Гібереліни	0,024 ± 0,0069	0,304 ± 0,027
Абсцизова кислота	0,876 ± 0,048	13,33 ± 0,182
Накопичення біомаси грибами, (г/л)	43,5 ± 3,05	44,6 ± 3,01

C. cladosporioides 495 була приблизно однакова: приріст маси сім'ядолей огірка відносно контролю становив 35,6 та 38,3% відповідно.

Аналіз комплексу фітогормональних речовин стимулювальної дії в супернатантах культуральних рідин *C. cladosporioides* 525 та *C. cladosporioides* 495 підтвердив результати біотестів і показав, що зазначені гриби здатні до синтезу ауксинів, цитокінінів та гіберелінів (табл. 4).

Штам *C. cladosporioides* 495 значно переважає *C. cladosporioides* 525 як за сумарним рівнем синтезу ауксинів, так і за здатністю синтезувати фізіологічно активний для рослин ауксин – індол-3-оцтову кислоту (ІОК). Так, вміст індольних сполук у культуральній рідині *C. cladosporioides* 495 у 18,3 рази перевищує аналогічний показник *C. cladosporioides* 525. Рівень синтезу ІОК штамом *C. cladosporioides* 495 у 17,8 разів вище, ніж *C. cladosporioides* 525.

Крім ІОК *C. cladosporioides* 495 у значній кількості синтезує індол-3-масляну кислоту (ІМК), рівень накопичення якої був у 1,5 разів вищим, ніж ІОК. ІМК є більш стабільною сполукою, ніж ІОК, і може розглядатися як запасна форма ІОК із певною ауксиною активністю [11]. *C. cladosporioides* 525 також синтезує ІМК, але у значно меншій кількості: 3,28 мкг/г сухої біомаси гриба проти 57,91 мкг/г сухої біомаси у *C. cladosporioides* 495.

Серед інших індольних сполук досліджувані гриби синтезують індол-3-оцтової кислоти гідразид, який здатен гальмувати розвиток фітопатогенних грибів та бактерій [12]. Вміст індол-3-оцтової кислоти гідразиду у супернатанті культуральної рідини *C. cladosporioides* 495 – 20,04 мкг/г сухої біомаси гриба, у супернатанті культуральної рідини *C. cladosporioides* 525 значно менший – 3,85.

Супернатант культуральної рідини *C. cladosporioides* 495 містив також значні кількості неактивних форм ауксинів: індол-3-карбоксальдегід, індол-3-карбінол та індол-3-карбоксілову кислоту відповідно 26,29; 30,34 та 23,44 мкг/г сухої біомаси гриба, які утворюються в результаті деградації ІОК. Серед зазначених індольних сполук *C. cladosporioides* 525 утворював лише незначну кількість індол-3-карбоксілової кислоти – 1,44 мкг/г сухої біомаси.

Таким чином, спектр індольних сполук, синтезованих досліджуваними грибами, відрізняється як за кількісним, так і за якісним складом.

Серед цитокінінів, що синтезуються штамми грибів, виявлено зеатин, зеатинрибозид, ізопентиніладенін та ізопентиніладенозин, загальний вміст яких майже не відрізнявся: *C. cladosporioides* 495 синтезував цитокінінів 28,95 мкг/г сухої біомаси, *C. cladosporioides* 525 – 26,96. Втім, співвідношення форм цитокінінів було різним. Штам *C. cladosporioides* 495 синтезував переважно зеатин (42,6% від загальної кількості) *C. cladosporioides* 525 – ізопентиніладенозин (38,2%).

Обидва штами грибів були здатні до утворення незначної кількості гіберелової кислоти. *C. cladosporioides* 495 продукував гіберелової кислоти 0,304 мкг/г сухої біомаси, *C. cladosporioides* 525 – 0,024.

Крім фітогормональних речовин стимулювальної дії досліджувані гриби синтезують абсцизову кислоту – фітогормон, здатний інгібувати ріст і розвиток та регулювати захисні реакції у рослин. Супернатант культуральної рідини *C. cladosporioides* 495 містив значну кількість абсцизової

кислоти – 13,33 мкг/г сухої біомаси гриба. Гриб *C. cladosporioides* 525 синтезував значно менше абсцизової кислоти – лише 0,876 мкг/г сухої біомаси (див. табл. 4).

Обговорення. Раніше вважалося, що координація системи регуляції та інтеграції процесів росту і розвитку рослин здійснюється за допомогою рослинних гормонів, які синтезуються спеціалізованими тканинами рослин і діють в надзвичайно малих дозах (10^{-3} - 10^{-5} моль/л). Пізніше було доведено, що багато мікроорганізмів, які знаходяться в тісній взаємодії з рослинами, також здатні синтезувати фітогормони. Метаболіти рослин, які виділяються в ризосферу, містять різноманітні біологічно активні сполуки, які є джерелом живлення мікроорганізмів. При цьому фітогормони виконують роль сигнальних молекул, що гармонізують взаємодію рослин з ризосферними мікроорганізмами. Наприклад, при взаємодії з рослинами, в корневих екsudатах яких міститься триптофан, біосинтез ауксинів мікроорганізмами також посилюється, адже триптофан є попередником ауксинів і саме ризосферна мікрофлора рослин відіграє ключову роль у його перетворенні в ІОК [13].

Синтезовані мікроорганізмами фітогормональні речовини, у свою чергу, впливають як на рослини, так і на самих продуцентів. Тому рослини та асоційовані з ними мікроорганізми, які заселяють одну екологічну нішу, необхідно розглядати як єдину систему. Втім, кожний з учасників цієї системи характеризується власною біохімічною активністю і, зрештою, синтезує одні й ті самі фітогормони, різниця в дії яких полягає лише в концентрації. В боротьбі за існування одержують переваги ті ризосферні мікроорганізми, які здатні виділяти фітогормони, що дозволяє їм успішніше колонізувати ризосферний ґрунт, поверхню коренів і проникати у внутрішні тканини рослин [14]. Саме тому пошук мікроорганізмів – активних продуцентів фітогормональних речовин є предметом досліджень багатьох наукових шкіл.

Перші із фітогормонів, які були досліджені, – ауксини. Ауксини відповідають за поділ і диференціацію рослинних клітин і тканин, стимулюють проростання насіння і бульб, прискорюють процеси коренеутворення, координують процеси вегетативного росту, тропізму, плодоутворення. Вони впливають на фотосинтез, утворення пігментів, біосинтез метаболітів і стійкість рослин до стресових факторів довкілля. Найбільшою біологічною активністю відзначається індоліл-3-оцтова кислота (ІОК), хоча відомі й інші сполуки з ауксиноюю активністю, які в більшості є індолами і за хімічною структурою близькі до ІОК. Такі індолні сполуки можуть служити попередниками індоліл-3-оцтової кислоти, або бути продуктами її подальшої трансформації.

Незважаючи на те, що і рослини, і мікроорганізми здатні до синтезу ІОК, шляхи її утворення різні. Так, в рослинних клітинах ІОК утворюється *de novo* із триптофану шляхом окислювального дезамінування через індоліл-3-пірвіноградну кислоту і індол-3-ацетальдегід, або шляхом утворення проміжного продукту – триптаміну через індол-3-ацетальдегід.

У мікроорганізмів нараховується 5 різних шляхів біосинтеза ІОК, ґрунтовим мікроміцетам притаманні тільки три з них. Так, у більшості фітопатогенних мікроміцетів з родів *Fusarium*, *Rhizoctonia* і *Colletotrichum* утворення ІОК відбувається найбільш поширеним шляхом через індоліл-

3-пірвиноградну кислоту і індол-3-ацетальдегід. Для неідентифікованих грибів, що утворюють мікоризу з орхідеями, характерним є альтернативний шлях синтезу ІОК через триптамін. У деяких фітопатогенних грибів роду *Colletotrichum* біосинтез ІОК відбувається через індоліл-3-ацетамід [2, 15, 16, 17].

В рослинах ІОК зв'язується з сахарами, амінокислотами і білками з утворенням неактивних (запасних) форм, з яких при необхідності фітогормон вивільнюється і відновлює свою фізіологічну активність [2]. Одержані нами результати вказують на те, що досліджувані гриби роду *Cladosporium* також здатні синтезувати запасні форми ІОК, зокрема індол-3-масляну кислоту.

Відомо, що здатність активно продукувати ІОК – штамова особливість мікроорганізмів. Серед мікроміцетів одного роду, і навіть виду, трапляються як високоактивні, так і штами з низькою активністю біосинтезу індоліл-3-оцтової кислоти, а також штами, які взагалі не утворюють ІОК. Одержані нами результати також вказують на значні розбіжності між штамами одного виду грибів за здатністю до синтезу ІОК. Так рівень синтезу ІОК штамом *C. cladosporioides* 495 у 17,8 разів вище, ніж *C. cladosporioides* 525.

Гібереліни – це найбільш поширена серед рослин і мікроорганізмів група фітогормонів, яка налічує більш, ніж 100 сполук. Гібереліни належать до класу дитерпенів і складаються з ізопренових залишків, які звичайно утворюють чотири кільця. Найбільш поширеними і біологічно активними фітогормонами цієї групи є гіберелові кислоти ГК₃, ГК₇, ГК₁ і ГК₄. Дія гіберелінів направлена на поділ і елонгацію клітин, які входять до складу інтеркалярних меристем, на стимулювання цвітіння, активацію синтезу мембран і амілолітичних ферментів.

Дослідження процесу продукування гіберелінів у рослин і грибів дозволяють вважати, що в процесі еволюції рослини і мікроміцети сформували незалежні шляхи біосинтезу цієї групи фітогормонів.

Здатність до біосинтезу гіберелінів виявлена серед всіх груп мікроорганізмів, але найбільш активними продуцентами є мікроміцети роду *Phaeosphaeria* і *Gibberella fujikuroi*, які здатні утворювати більш, ніж 1000 мг/л гіберелової кислоти [2].

Активні продуценти гіберелінів трапляються, в основному, серед фітопатогенних грибів: *Ustilago mayis*, *Sphaceloma manihoticola*, *Cercospora rosicola*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium semitectum*, *F. acuminatum*, *F. anguoides*, *F. avenaceum*, *F. chlamyosporum*, *F. equiseti*, *F. osyosporum*, *F. moniliforme*, *F. graminearum* [2, 18, 19].

Як свідчать одержані нами дані, обидва досліджувані штами *C. cladosporioides* 495 та *C. cladosporioides* 525 характеризувалися низькою гібереліновою активністю і були здатні до утворення незначної кількості гіберелової кислоти: 0,304 і 0,024 мкг/г сухої біомаси відповідно.

Цитокініни за хімічною структурою є похідними аденіну. В залежності від будови молекули пуринового кільця фізіологічна активність цитокінінів буде відрізнятися. Саме цим пояснюється той факт, що цитокініни регулюють різні фізіологічні процеси: активізують синтез РНК і білка в клітинах шляхом активізації РНК-полімерази, стимулюють поділ рослинних клітин, сприяють розгалуженню, стимулюють проростання на-

сіння, регулюють формування хлоропластів, підвищують стабільність фотосинтетичного апарату за водного стресу, сприяють стійкості клітин до несприятливих умов навколишнього середовища [2].

Мікроорганізми здатні синтезувати такі цитокініни, як кінетин, зеатин, ізопентеніладенін і деякі інші. Сполуки з цитокініновою активністю виявлені у грибів з родів *Paxillus*, *Rhizopogon*, *Suillus* (які утворюють мікоризу з рослинами), а також у фітопатогенних грибів, що належать до родів *Uromyces*, *Schizophyllum*, *Taphrina* [17, 20].

Тривалий час з рослин не вдалося виділити гени біосинтезу цитокінінів. Це давало привід сумніватися в тому, що рослини дійсно утворюють зазначені гормони, але у 2001 році в *Arabidopsis thaliana* були виявлені гени, які кодують функціонально активний ключовий фермент біосинтезу цитокінінів – ізопентенілтрансферазу. Ті ж гени знайдені також у бактерій і у такого фітопатогенного гриба, як *Taphrina cerasi* [17, 21].

Деякі гриби родів *Aspergillus* і *Penicillium* здатні активно використовувати цитокініни як додаткове джерело азоту. Екзогенні цитокініни стимулюють біосинтез мікроорганізмами антибіотиків, амінокислот, деяких ферментів, а також фітогормональних речовин [17, 22].

Нами показано, що досліджувані гриби синтезують такі цитокініни, як зеатин, зеатинрибозид, ізопентеніладенін та ізопентеніладенозин, загальний вміст яких майже не відрізнявся: *C. cladosporioides* 495 синтезував цитокінінів 28,95 мкг/г сухої біомаси, *C. cladosporioides* 525 – 26,96.

Відомо, що серед грибів роду *Cladosporium* трапляються ендоефітні, сапротрофні та фітопатогенні гриби, крім того, представники роду можуть бути збудниками хвороб тварин [23, 24]. З огляду на зазначене, перспективні штами повинні бути безпечними для людини і теплокровних тварин. Раніше нами була проведена перевірка патогенних властивостей *C. cladosporioides* 525 і *C. cladosporioides* 495. Одержані результати засвідчили, що досліджені штами належать до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи теплокровних тварин і можуть вважатися непатогенними [25].

Отже, зважаючи на непатогенність штамів *C. cladosporioides* 525 і *C. cladosporioides* 495 та їх здатність продукувати фітогормональні речовини ріст-стимулювальної дії, зазначені штами можна вважати перспективними для використання в сільськогосподарському виробництві.

Л.А. Белявская¹, Е.В. Надкержичная², О.Б. Копылова²

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
ул. Академіка Заболотного 154, Київ, 03143, Україна

² Інститут сільськогосподарської мікробіології
і агропромислового виробництва НААН,
ул. Шевченко, 97, Чернігов, 14027, Україна

БИОСИНТЕЗ ФИТОГОРМОНОВ ПОЧВЕННЫМИ ГРИБАМИ *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

Резюме

Цель. Исследовать рост-регулирующие активности культуральных жидкостей почвенных грибов рода *Cladosporium* и биосинтез ими фитогормональных веществ.

Методы. Определение рост-регулирующей активности культуральной жидкости

грибов *C. cladosporioides* 525 и *C. cladosporioides* 495 проводили методом специфического биотестирования, содержание фитогормонов (ауксинов, цитокининов и абсцизовой кислоты) в супернатанте культуральных жидкостей – методом количественной спектроденситометрической тонкослойной хроматографии. **Результаты.** Показано, что почвенные грибы *Cladosporium cladosporioides* способны к синтезу фитогормональных веществ стимулирующего действия: ауксинов, цитокининов и гиббереллинов. В результате скрининга отобрано два перспективных штамма *C. cladosporioides* 525 и *C. cladosporioides* 495. Штамм *C. cladosporioides* 495 значительно превосходил *C. cladosporioides* 525 как по суммарному уровню синтеза ауксинов, так и по способности синтезировать физиологически активный для растений ауксин – индолил-3-уксусную кислоту. Среди цитокининов, синтезируемых грибами, обнаружены зеатин, зеатинрибозид, изопентиниладенин и изопентиниладенозин, общее содержание которых почти не отличалось. Оба штамма грибов были способны к образованию небольшого количества гибберелловой кислоты. **Вывод.** Способность исследуемых штаммов продуцировать фитогормональные вещества рост-стимулирующего действия позволяет считать их перспективными для использования в сельскохозяйственном производстве.

Ключевые слова: *Cladosporium cladosporioides*, фитогормоны, ауксины, цитокинины, гиббереллины.

L.O. Biliavska¹, O.V. Nadkernychna², O.B. Kopilova²

¹ Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology National Academy of Sciences of Ukraine,

154, Acad. Zabolotny str., D03680, Kyiv, GSP Ukraine

² Institute of Agricultural Microbiology and agricultural production NAAS
97, Shevchenko str., Chernihiv, 14027, Ukraine

PHYTOHORMONES BIOSYNTHESIS BY SOIL MOLDS *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

Summary

The aim. Investigate the growth-regulatory activity of *Cladosporium* soil molds culture liquids and phytohormone biosynthesis. **Methods.** Determination of *C. cladosporioides* 525 and *C. cladosporioides* 495 culture liquid growth-regulatory activity was investigated with methods of specific bioassay for phytohormones maintenance (auxins, cytokinins and abscisic acid) such as TLC-method. **Results.** We obtained that soil molds *Cladosporium cladosporioides* capable for synthesis of phytostimulating substances such as auxins, cytokinins and gibberellins. There were two promising strains selected *C. cladosporioides* 525 and *C. cladosporioides* 495. The strain *C. cladosporioides* 495 significantly exceeded *C. cladosporioides* 525 by the total level of synthetic auxin and also by its ability for synthesizing physiologically active plant auxin - indole-3-acetic acid. Among cytokinins synthesized with the molds were found zeatin, zeatin riboside, izopentyniladenin and izopentyniladenozin. Their maintenance were near equal in culture liquid. Both strains of molds were capable to produce large amounts of gibberellic acid. **Conclusions.** The ability of the strains to produce phytohormonal substances allows us to consider them promising to be used in agricultural production.

Keywords: *Cladosporium cladosporioides*, plant hormones, auxins, cytokinins, gibberellins.

1. *Kulaeva ON, Kuznetsov VV* [Recent advances and perspectives in the study of cytokines]. Russian Journal of Plant Physiology. 2002; 49 (4):626-640. Russian
2. *Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TA, Netrusov AI* [Hormones and hormone-like substances of microorganisms: A review]. Applied Biochemistry and Microbiology. 2006; 42 (3):261–268. Russian
3. Patent 92094, UA, C12N1/20 №2003109795 / Iutynska GO, Biliavska LO, Dragovoz IV, Kozyrityska VE, Valagurova OV, Yavorska VK, Kurchiy BO. [The use of *Streptomyces avermitilis* strain IMV Ac-5015 as a producer of complex phytohormones]. Bull. 2005; 9. Ukrainian
4. Patent 2085078 RU, A01N63 / 04, C12N1 / 14, S12R1: 645 / Muromtsev GS, Krasnopolskaya LM, AP Makeeva, Nagubnova LA. [Strain Mikromitcety *Cercospora* sp. - Producing plant hormone abscisic acid]. Publ. 1997. Russian
5. Patent 2084531 RU, A12R27 / 00 A01 N63 / 04, C12N1 / 14, S12R1: 77 / Muromtsev GS, Krasnopolskaya LM. [Strain Mikromitcety *Fusarium moniliforme* - producing plant hormones gibberellin A₄A₇]. Publ. 1997. Russian
6. *Feofiliva EP* [Fungi: the heterogeneity of physiological and biochemical characteristics and the proximity to the plants, animals and prokaryotes] Applied Biochemistry and Microbiology. 2001; 37 (2): 288-299. Russian
7. *Savinsky SV, Kofman ISH, Kofanov VI, Stasevskaya IL* [Methodological approaches to the determination of plant hormones using TLC-method] Physiology and biochemistry of cultivated plants. 1987; 19 (2): 210-215. Ukrainian
8. *Savinsky SV, Dragovoz IV, Pedechko VK*. [Determination of zeatin, indolyl-3-acetic acid and abscisic plant samples from one probe with PLC-method]. Physiology and biochemistry of cultivated plants. 1991; 23 (6): 606-614. Ukrainian
9. *Muromtsev GS, Agnistikova VN*. [Gibberellines]. M.: Nauka; 1984. Russian
10. *Biliavska LO, Kozyrityska VE, Valaghurova EV, Iutynska GA*. [Biologically active substances of preparation avercom]. Microbiol Z. 2012; 74 (3):10-15. Ukrainian
11. *Epstein E, Müller J.-L*. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia plantarum*. 1993; 88:382-389.
12. Lacret R, Oves-Costales D, Gomez C, Diaz C, Cruz M, Perez-Victoria I, Vicente F, Genilloud O, Reyes F. New ikarugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis*. *Mar. Drugs*. 2015; 13: P.128-140; doi:10.3390/md13010128.
13. *Kravchenko LV, Azarova TS, Makarova NM, Tihonovich IA*. [The role of tryptophan in the root exometabolites for fitostimulating activity of rhizobacteria]. Microbiol. 2004; 73(2): 195-198. Russian
14. *Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TA, Netrusov AI* [The microorganisms – producers of plant growth stimulants and their practical application (review)]. Applied Biochemistry and Microbiology. 2006; 42 (2):133-143. Russian
15. *Chung KR, Shilts T, Erturk U. et al* Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; 226 (1): P. 23-30.
16. *Furukawa T, Koga J, Adachi T. et al*. Efficient Conversion of L-Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid and/or Tryptophol by Some Species of *Rhizoctonia*. *Plant Cell Physiol*. 1996; 37:899-905.
17. *Maor R, Haskin S, Levi-Kedmi H, Sharon A*. In *Planta Production of Indole-3-Acetic*

- Acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene*. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70 (3):1852-1854.
18. *Desjardins AE, Manandhar HK, Plattner RD. et al.* *Fusarium* species from nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(3):1020-1025.
 19. *Mitter N, Srivastava A., Renu K. et al.* Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia.* 2002; 153 (4):187-193.
 20. *Janitor A.* Growth of mycelia of phytopathogenic fungi after application of abscisic acid in in vitro conditions. *Plant Protection Science* 2002; 38(3):94-97.
 21. *Iutynska GO, Biliavska LA, Kozyrtska VE.* [Microbial bioformulations phytoprotective, growth regulator and adaptogenic action for crop production]. Theory, practice and perspectives of the application of biologically active compounds in agriculture: proceedings of the XIth international scientific-applied conference daRostim, 2015 June 17–19, Syktyvkar, Russian.
 22. *Vereecke D, Bursse S, Simon-Mateo C.* The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta.* 2000; 210 (2):0241-0251.
 23. *Dugan FM, Schubert K, Braun U* Check-list of *Cladosporium* names. *Schlechtendalia.* 2004; 11:1-103.
 24. *Crous PW, Braun U, Schubert K, Groenewald JZ.* Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Stud Mycol.* 2007; 58: P. 33-56.
 25. *Kravchenko NO, Kopylova OB, Golovach OV, Dmytruk OM.* [Pathogenicity valuation of soil molds from *Cladosporium* genus]. *Agricultural Microbiology: inter. thematic.. science. coll. - Chernihiv: ISMAV NAAS, 2015; 21: 7-11. Ukrainian*

Отримано 12.10.2016