

**О.М. Юр'єва¹, І.В. Драговоз¹, Н.О. Леонова¹, А.М. Остапчук²,
М.А. Хархота¹, С.О. Сирчін¹, І.М. Курченко¹**

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

²Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ГІБЕРЕЛІНИ ЕНДОФІТНОГО І САПРОТРОФНОГО ШТАМІВ *PENICILLIUM FUNICULOSUM*

Мета. Дослідження загальної фітостимулювальної і гіберелової активностей, а також якісного і кількісного складу екстрацелюлярних гіберелінів ендоефітного і сапротрофного штамів *Penicillium funiculosum*. **Методи.** Мікробіологічні, фізіологічні і фізико-хімічні (HPLC/MS) методи досліджень. **Результати.** Встановлено, що фітостимулювальна активність штама-ендофіта *P. funiculosum* чітко проявлялась у нерозведеному культуральному фільтраті (КФ) та у розведеннях 1:100 ÷ ÷ 1:500, в той час як у сапротрофа вона була значно нижчою і спостерігалась лише за певних розведень (1:400 і 1:500). У специфічному біотестуванні на гіберелову активність екстракт КФ ендоефітного штаму був утричі активнішим порівняно з сапротрофним – 30% і 10% відповідно. HPLC/MS аналіз показав, що ендоефіт і сапротроф *P. funiculosum* синтезують гібереліни: ГК₃ (6,8 нг/г АСБ і 4,1 нг/г АСБ відповідно), ГК₄ (4,9 нг/г АСБ і 11,6 нг/г АСБ) і слідові кількості ГК₇. **Висновки.** Досліджені ендоефітний і сапротрофний штами *P. funiculosum* синтезують біологічно активні гібереліни ГК₃, ГК₄ і ГК₇, що може відігравати важливу фізіологічну роль у формуванні ними симбіотичних та асоціативних взаємовідношень з рослинами.

Ключові слова: *Penicillium funiculosum*, ендоефіти, сапротрофи, гібереліни, біотестування, HPLC/MS.

Ендоефітні гриби є унікальним об'єктом і новим джерелом природних біоактивних речовин, зокрема, фітогормональних сполук, та мають потенціал щодо застосування у рослинництві і медицині [8–16, 20, 25]. В останнє десятиріччя особливу увагу дослідників зосереджено на вивченні біорізноманітності ендоефітних грибів, їх екології та здатності синтезувати біологічно активні метаболіти [8–16, 21, 30]. Так, відкрито нові біологічно активні сполуки, серед яких більша частина припадає саме на ендоефіти [26]. Мікроскопічні гриби родів *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* здатні до синтезу гіберелінів, що є відомим класом фітогормонів стимулювальної дії [1, 10–16, 21, 28, 30]. Показано, що ендоефіти роду *Penicillium* продукують позаклітинні гібереліни для подолання негативного впливу біотичних та абіотичних факторів довкілля рослиною-хазяїном [9–16, 21, 30]. Так, *Penicillium funiculosum* Thom існує у різноманітних еконішах, є ендоефітом багатьох рослин, зокрема, входить до комплексу грибів-ендофітів сфагнових боліт Полісся України [10, 15, 19]. Вид *P. funiculosum* синтезує спектр вторинних метаболітів, у тому числі фітогормони-стимулятори (гібереліни, індоліл-3-оцтову кислоту) [8, 10, 15, 33]. В той же час інтерес до вивчення цього виду обумовлений відсутністю відомостей щодо його

здатності викликати захворювання рослин і продукувати токсини [18]. Одним з проявів симбіотичних властивостей ендоефітів вважають саме здатність до синтезу речовин фітогормональної природи, що підвищують стійкість рослин до таких стресових чинників, як сольовий стрес, посуха, високі температури, важкі метали [9–16].

Метою нашої роботи було дослідження загальної фітостимулювальної і гібереллової активностей, а також якісного і кількісного складу екстрацелюлярних гіберелінів штамів *Penicillium funiculosum* з різних еконіш (ендоефіт і сапротроф).

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були ендоефітний штам *P. funiculosum* 16795, виділений з листа журавлини, та ґрунтовий 16790 з колекції культур мікроскопічних грибів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Ідентифікацію досліджених штамів проводили за методом ПЛР-баркодингу з праймерами ITS1 і ITS4. Отримані фрагменти ДНК розмірами 439 та 440 пн секвенували за Сангером [32]. За даними BLAST ендоефітний і сапротрофний штами визначено як *Talaromyces funiculosus* (анаморфа *Penicillium funiculosum*) і зареєстровано в GenBank за номерами KY620212 і KY865175 відповідно.

Культивування мікроміцетів проводили в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл у глибинних умовах (210÷230 об/хв) за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом 6 діб [2] у рідкому поживному середовищі наступного складу: глюкоза – 1%; пептон – 1%; KCl – 0,05%; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,05%; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,001% [30].

Середовище засівали інокулюмом – 24-годинною культурою мікроміцета, вирощеного у картопляно-глюкозному середовищі [2] у зазначених вище умовах; об'єм поживного середовища складав 200 мл, кількість інокулюму – 5%. Після завершення культивування міцелій гриба відділяли фільтруванням через обеззолені паперові фільтри (синя стрічка). Отримані культуральні фільтрати (КФ) та їх розведення використовували для визначення загальної фітостимулювальної активності. Міцелій гриба висушували за температури 70°C до постійної ваги. Кількість продукованих гіберелінів виражали в нг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ).

Екстракти для визначення гіберелінової активності отримували екстрагуванням КФ досліджених штамів етилацетатом (рН 2,5) [17]. Екстракти випарювали та перерозчиняли у 80%-ному етанолі. Отримані екстракти зберігали за температури -24°C , використовували для специфічного біотестування та для якісного і кількісного визначення гіберелінів методом HPLC/MS.

Загальну фітостимулювальну активність КФ досліджених штамів мікроміцетів оцінювали методом рулонної культури, використовуючи насіння озимої пшениці сорту Альбатрос одеський [5]. Рулони з насінням ставили у склянки з відстояною водопровідною водою і розведеннями КФ (1:100 ÷ 1:500) для кожного штаму гриба. Як контроль використовували відстояну водопровідну воду, як позитивний контроль – препарат-еталон Ендоефіт-L1 (ЧП «ПКФ Імпторгсервіс», Україна) у концентрації 10^{-5}M згідно з рекомендаціями виробника. Морфометричні виміри проростків проводили на 7-му добу росту. Оцінювали приріст сирої біомаси коренів

і паростків, результати виражали у відсотках відносно контролю. Повторність дослідів трикратна.

Для визначення гіберелової активності використовували гіпокотилі проростків огірка сорту Ніжинський за методикою Браєна та Лемінга у модифікації Агністікової [24]. Насіння (по 20 шт.) розкладали у чашки Петрі з попередньо зволуженим фільтрувальним папером. При замочуванні в чашку вносили 20 мл води, а через дві доби – ще 7 мл. Насіння пророщували у темряві за +24°C протягом трьох діб. Для аналізу відбирали однакові проростки із сім'ядолями, які наполовину чи повністю звільнилися від насінневої шкірочки, та з гіпокотиллями довжиною 4–7 мм; проростки, у яких шкірочка важко відокремлювалась, не використовували. Проростки (по 10 штук) розкладали у чашки Петрі з аліквотами (10 мл) водних розчинів екстрактів КФ штамів мікроміцетів у розведеннях 1:100÷1:500. Зразки витримували у термостаті за тієї ж температури протягом доби. Після закінчення експозиції вимірювали довжину гіпокотилів, зміни якої виражали у % приросту щодо контрольного варіанту. Контролі – відстоєна водопровідна вода і гіберелова кислота (ГК₃) у концентрації 10⁻⁵М.

Якісне і кількісне визначення гіберелінів проводили методом рідинної хромато-мас-спектрометрії (LC/MS) з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) та мас-спектрометричного детектора Agilent G1956B. Детекцію гіберелінів здійснювали також за допомогою діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при довжинах хвиль 198 і 210 нм у діапазоні 190–400 нм і флуоресцентного детектора при E_x – 210 нм, E_m – 410 нм. Розділення проводили на аналітичній колонці Zorbax SB-C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, США), швидкість потоку рухомої фази через колонку – 0,35 мл/хв, температура термостата колонки – 30°C, об'єм інжекції – 3 мкл. Елюювання проводили у градієнтному режимі в системі ацетонітрил (А) – 0,1% розчин мурашиної кислоти у воді (В). Вміст 20% А витримували впродовж 5 хв, далі збільшували до 80% за 10 хв з наступним збільшенням до 100% за 0,5 хв. Таке співвідношення залишали впродовж наступних 8,5 хв. Для ідентифікації використовували стандартні розчини гіберелінів ГК₃, ГК₄ і ГК₇ (Sigma-Aldrich, Німеччина).

Молекулярні маси досліджених гіберелінів визначали за допомогою одноквадрупольного мас-спектрометричного детектора. Іонізацію проводили у режимі електростатичного розпилення (ESI) з формуванням негативних іонів. Ідентифікацію досліджених компонентів проводили в режимі SCAN у діапазоні 200–500 m/z. ГК₃, ГК₄ і ГК₇ ідентифікували шляхом порівняння їх часів утримання із відповідними стандартами, визначення їх спектральних характеристик і значень мас їх молекулярних іонів. Кількісний вміст ГК₃, ГК₄ і ГК₇ визначали методом зовнішньої калібровки в режимі SIM за іонами 345, 331 та 329 m/z.

LC/MS аналіз екстрактів штамів *Penicillium funiculosum* 16790 і 16795 на гіберелову активність виконано у Центрі колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Для статистичної обробки даних використовували пакети Microsoft Excel та Origin 8.0 (OriginLab).

Результати. При дослідженні загальної фітостимулювальної активності екзометаболітів ендоефітного штаму *P. funiculosus* встановлено приріст біомаси паростків і коренів озимої пшениці у всіх розведеннях КФ (рис. 1 а). Найбільший прояв фітостимулювальної активності КФ ендоефітного штаму *P. funiculosus* щодо коренів озимої пшениці спостерігали у розведеннях 1:100 і 1:200, паростків – 1:200 і 1:300. На противагу цьому нерозведений КФ сапротрофного штаму та у розведеннях 1:100 і 1:200 пригнічував накопичення біомаси щодо контролю (рис. 1 б). При подальших розведеннях КФ (1:400, 1:500) спостерігали незначний приріст біомаси паростків і коренів озимої пшениці щодо контролю. Препарат-еталон Ендоефіт-L1 ($10^{-5}M$) стимулював приріст паростків і коренів пшениці на 23% і 8% відповідно.

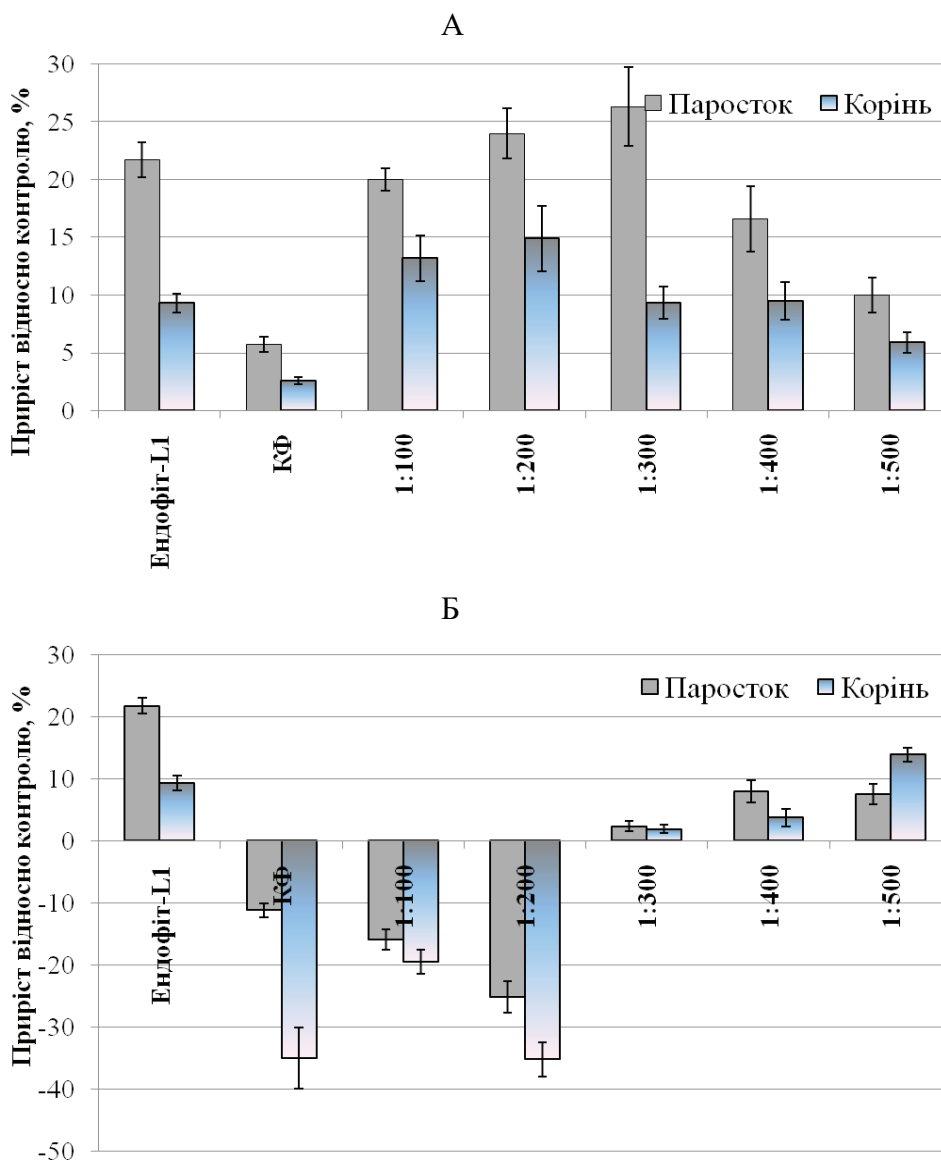


Рис. 1. Загальна рістстимулювальна активність екзометаболітів ендоефітного (А) і сапротрофного (Б) штамів *P. funiculosus*.

Приріст біомаси паростків і коренів озимої пшениці свідчить про фітостимулювальну активність КФ ендofітного штаму *P. funiculosum*. Зниження фітотоксичності КФ сапротрофного штаму при подальших розведеннях вказує на те, що серед його екзометаболітів присутні також сполуки із фітостимулювальною активністю.

Використання рулонного методу не дає можливості визначити природу фітогормональних сполук досліджених КФ, тому проведено вивчення фітостимулювальної активності екзометаболітів штамів *P. funiculosum* за допомогою специфічного біотесту на гіберелову активність. У специфічному біотесті екстракт КФ ендofітного штаму *P. funiculosum* у розведеннях 1:100 і 1:200 характеризувався фітотоксичною дією щодо огірків сорту Ніжинський та становив 55% і 10% відповідно (рис. 2). Грунтовий штам також виявляв інгібувальну дію 10% у розведенні 1:100.

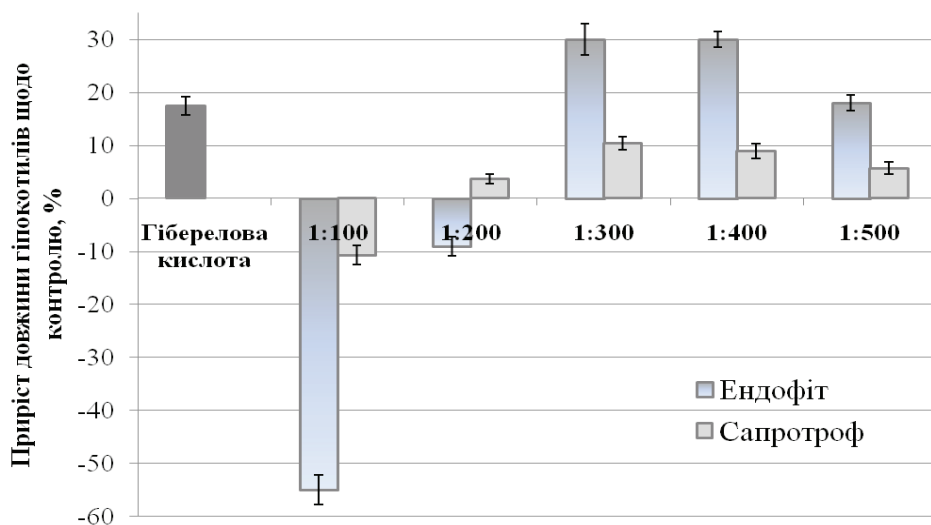


Рис. 2. Добовий приріст гіпокотилів огірків сорту Ніжинський за дії етанольних екстрактів КФ ендofітного і грунтового штамів *P. funiculosum*.

Важливо зазначити, що обидва досліджені штами пригнічували приріст довжини гіпокотилів огірків у розведеннях 1:100 і 1:200. При подальших розведеннях 1:300÷1:500 спостерігали ефект стимулювання: для ендofіта він становив 30% у розведеннях 1:300 і 1:400, у той час як для грунтового штаму – лише 10% (1:300).

Дані біотестів є інтегральним показником впливу екзометаболітів штамів *P. funiculosum* на рослини, проте для визначення якісного складу гіберелінів необхідні фізико-хімічні методи, зокрема, універсальні методи вискоєфективної рідинної хроматографії з мас-спектральним аналізом (HPLC/MS). У результаті HPLC/MS-аналізу досліджених екстрактів КФ *P. funiculosum* встановлено, що речовина з часом утримання (R_t) 3,9 хв та мас-спектром 345 m/z відповідає гібереліну ГК₃ (рис. 3 а, б). Час утримання речовини з R_t 14,6 хв з мас-спектром 331 m/z відповідає гібереліну ГК₄, а мас-спектр 329 m/z – гібереліну ГК₇.

В екстрактах КФ досліджених штамів визначено також кількісний вміст гіберелінів. Так, ендofітний штам синтезував гібереліни: ГК₃ – 6,8 нг/г АСБ, ГК₄ – 4,9 нг/г АСБ, а також слідові кількості ГК₇ (рис. 3 а, таблиця).

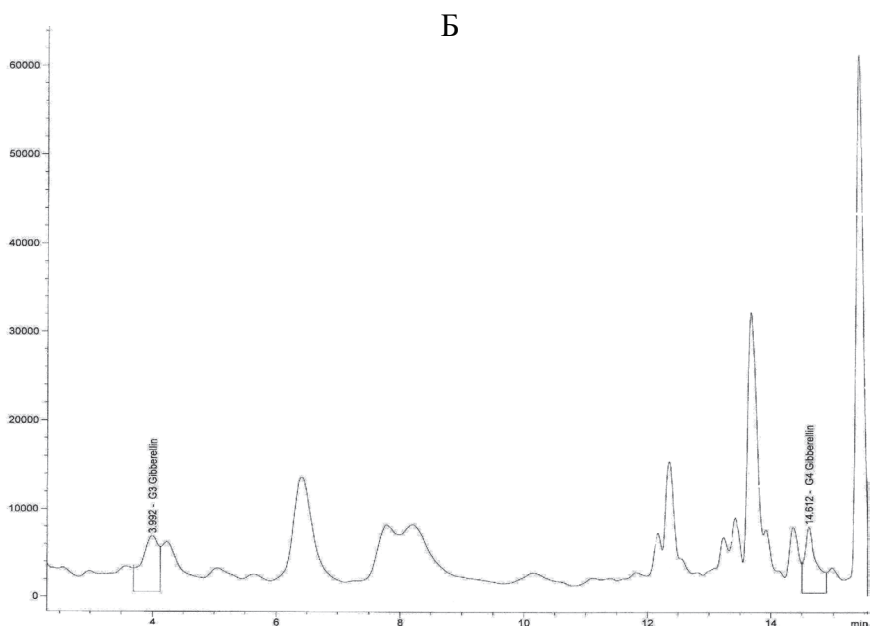
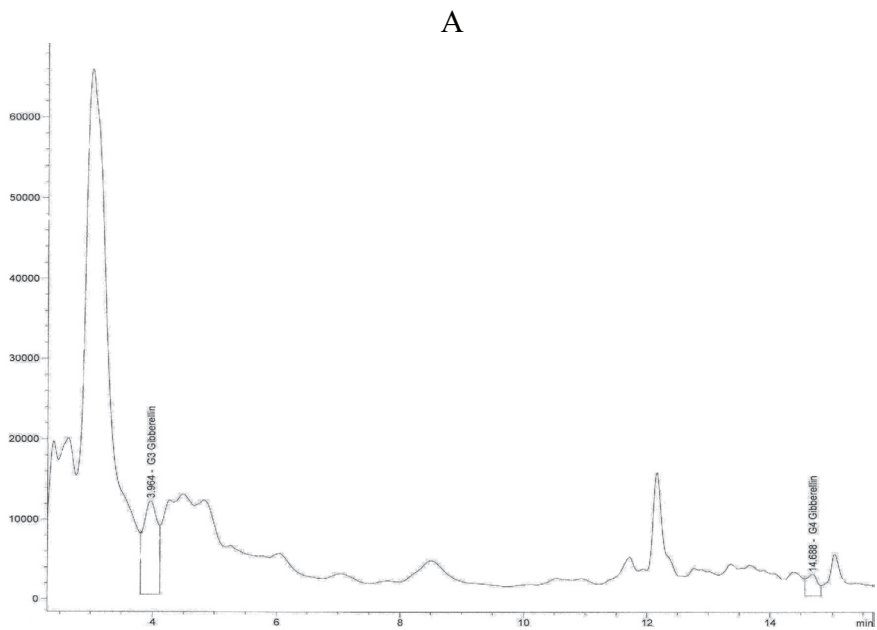


Рис. 3. Хроматограма гіберелінів у екстрактах ендоефітного (А) і сапротрофного (Б) штамів *P. funiculosus*.

Таблиця
Вміст гіберелінів у екстрактах КФ штамів *P. funiculosus*

Штам	Кількість гіберелінів, нг/г АСБ			
	ГК ₃	ГК ₄	ГК ₇	Σ
Ендоефіт 16795	6,8	4,9	слідові кількості	11,7
Сапротроф 16790	4,1	11,6	слідові кількості	15,7

Хроматографічний аналіз і мас-спектрометрія екстрактів КФ ґрунтового штаму *P. funiculosum* показали наявність гіберелінів ГК₃ (4,1 нг/г АСБ), ГК₄ (11,6 нг/г АСБ) і ГК₇, що було сумарно вище на 25,5% порівняно з ендоефітом (рис. 3 б, таблиця).

Таким чином, КФ ендоефіта *P. funiculosum* характеризувався фітостимулювальною активністю у розведеннях 1:200 і 1:300. Проте сапротроф у цих розведеннях пригнічував приріст біомаси паростків і коренів озимої пшениці, а при подальших розведеннях (1:400 і 1:500) – незначною мірою стимулював. У специфічному біотестуванні на гіберелову активність ендоефітний і сапротрофний штами *P. funiculosum* проявили фітостимулювальну дію – 30% і 10% відповідно. На підставі специфічного біотестування і HPLC/MS-аналізу встановлено здатність штамів *P. funiculosum* з різних еконіш продукувати спектр гіберелінів ГК₃, ГК₄ і ГК₇. Методом HPLC/MS показано, що ендоефіт і сапротроф *P. funiculosum* синтезують гібереліни: ГК₃ (6,8 і 4,1 нг/г АСБ відповідно), ГК₄ (4,9 і 11,6 нг/г АСБ) і слідові кількості ГК₇.

Обговорення. Відомо, що різні мікроорганізми здатні синтезувати речовини фітогормональної природи [5, 8–16, 22]. Основними комерційними продуцентами гіберелінів є саме мікроміцети [23, 27]. Незважаючи на те, що гібереліни вважають рослинними гормонами, вперше їх було виділено з фітопатогенного гриба *Fusarium moniliforme* (телеоморфа *Gibberella fujikuroi*), що уражував рослини рису [23]. На сьогодні відомо, що *G. fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, *F. konzum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *Aspergillus fumigatus*, *Phaeosphaeria* sp., *Penicillium citrinum*, *P. janthinellum*, *P. resedanum*, *P. funiculosum* синтезують гібереліни [1, 8–16, 28, 31]. Ендоефіти, що належать до різних видів грибів, в тому числі роду *Penicillium*, синтезують позаклітинні гібереліни, особливо за дії стресових факторів [10, 13, 15, 16]. Відомо, що деякі види мікроміцетів продукують значно більшу кількість гіберелінів, зокрема, ГК₃, порівняно з рослинами [27].

На сьогодні у рослинах, бактеріях і грибах ідентифіковано 136 різних форм гіберелінів, 25 з них ідентифіковано у різних видів грибів [27], проте фізіологічно активними є ГК₁, ГК₃, ГК₄ і ГК₇, інші ж гібереліни не проявляють високої активності та є попередниками біосинтезу інших форм [4].

Відомо, що синтез вторинних метаболітів ендоефітами змінюється залежно від складу і рН поживного середовища. Так, на середовищі Чапека з пептоном показано вищий рівень синтезу гіберелінів, індоліл-3-оцтової, щавлевої, хінної, яблучної та лимонної кислот [30]. Хроматографічний аналіз культуральних фільтратів ендоефітів, виділених з коренів сої та огірка (*Chrysosporium pseudomerdarium*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Phoma glomerata* і *Paecilomyces formosus*), показав наявність гіберелінів ГК₁ (0,05–10,55 нг/мл), ГК₃ (0,48–9,0 нг/мл), ГК₄ (0,2–8,0 нг/мл), ГК₇ (1,4–6,5 нг/мл) і ГК₉ (0,03–1,05 нг/мл). В зв'язку з цим для наших досліджень було обрано саме поживне середовище Чапека з пептоном.

Ендоефітні штами *Penicillium citrinum*, *Penicillium* sp. МН7, *P. minioluteum* LHL09 і *P. funiculosum* синтезують фізіологічно активні і

неактивні форми гіберелінів [6, 10, 13, 15]. У культуральному фільтраті ендоефіта *P. citrinum*, виділеного з коренів *Ixeris repens* (L.) A. Gray, виявлено фізіологічно активні гібереліни ГК₁, ГК₃, ГК₄ і ГК₇ (1,95; 3,83; 6,03 і 2,35 нг/мл відповідно) і неактивні – ГК₅, ГК₉, ГК₁₂, ГК₁₅, ГК₁₉, ГК₂₀ і ГК₂₄ [13]. *Penicillium* sp. SJ-2-2, виділений із коренів галофіта болота Санчеонської затоки у Південній Кореї, синтезував також більшу кількість ГК₁, ГК₃, ГК₄ і ГК₇, ніж *F. fujikuroi* [31]. Подібні результати отримано для *P. citrinum* [13].

Показано, що ендоефіт коріння огірка *Penicillium* sp. LWL3 синтезує ГК₁ і ГК₃ [30]. У гриба-ендоефіта *P. janthinellum* LK5, виділеного з томату, виявлено біоактивні гібереліни ГК₃, ГК₄ і ГК₇ [14]. Комбіноване застосування ендоефітного штаму *P. resedanum* LK6 і ГК₃ зменшувало негативний вплив сольового стресу на перець (*Capsicum annuum* L.) [16]. Крім того, встановлено збільшення біомаси, довжини коренів, вмісту хлорофілу і покращення фотосинтетичних показників перцю за дії штаму *P. resedanum* LK6, що синтезував більшу кількість гіберелінів ГК₁ і ГК₄ та незначну ГК₃ порівняно з *F. fujikuroi*.

Дослідження КФ ендоефіта *Exophiala* sp., ізольованого з огірка, показало присутність фізіологічно активних гіберелінів – ГК₁, ГК₃, ГК₄ і ГК₇ та неактивних – ГК₅, ГК₈, ГК₉, ГК₁₂ і ГК₂₀. Кількість гіберелінів цього штаму, за винятком ГК₃, була вищою, ніж у штаму *F. fujikuroi* [9].

Каном зі співавт. показано, що за дії сольового стресу (70 і 140 мМ) ендоефіт *P. funiculosum* LHL06 покращував морфометричні і фотосинтетичні параметри сої порівняно із стерильними рослинами. Встановлено присутність у культуральних фільтратах *P. funiculosum* LHL06 фізіологічно активних гіберелінів ГК₁ – 1,53 нг/мл; ГК₄ – 0,34 нг/мл; ГК₈ – 1,21 нг/мл; ГК₉ – 37,87 нг/мл [10].

Ендоефітний штам *P. funiculosum* LHL06 за впливу токсичних металів (Cu²⁺ і Cd²⁺) характеризувався вищою швидкістю росту порівняно з іншими ендоефітами *Metarhizium anisopliae*, *Promicromonospora* sp. і *Exophiala* sp., а також стимулював приріст надземної біомаси і кореневої системи рослин. Це, на думку авторів, свідчило про підвищення їх резистентності щодо дії токсичних металів [15].

З ризосфери і ризоплани бобів (*Vicia faba*), джугу довгоплідного (*Corchorus olitorius*), кунжуту (*Sesamum indicum*) і сої (*Glycine max*) ізольовано *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium corylophilum*, *P. cyclopium*, *P. funiculosum* і *Rhizopus stolonifer*, що здатні продукувати гібереліни за підвищеної концентрації (0,5–1,0%) NaCl у поживному середовищі, що може свідчити про зменшення негативного впливу на рослини [7]. На думку авторів, ґрунтові штами можуть підтримувати родючість ґрунту шляхом синтезу гіберелінів, що стимулюють ріст і розвиток рослин.

Біосинтез гіберелінів мікроскопічними грибами принципово відрізняється від рослин на геномному, генетичному і біохімічному рівнях [27]. Зокрема, у рослинах ент-каурен синтезується метилеритритол фосфатним шляхом (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, МЕР), тоді як у грибів – через мевалонову кислоту. На основі отриманих нами експериментальних даних і даних літератури щодо інших представників роду *Penicillium*

[21] можна зробити висновок, що схема синтезу гіберелінів досліджених штамів *P. funiculosus* подібна до такої *G. fujikuroi*, а не *Phaeosphaeria* sp. L487 і *Sphaceloma manihoticola* [23]. Спираючись на схему біосинтезу гіберелінів у грибів [27], можна припустити, що досліджені нами штами *P. funiculosus* синтезують гібереліни за відомим для *G. fujikuroi* шляхом.

Таким чином, КФ ендofіта *P. funiculosus* стимулював приріст біомаси проростків озимої пшениці; протилежну закономірність встановлено для сапротрофа – пригнічення приросту і незначна стимуляція при подальших розведеннях. У специфічному біотестуванні ендofітний і сапротрофний штами *P. funiculosus* характеризувались гібереловою активністю (стимуляція гіпокотилів огірків на 30% і 10% відповідно). За результатами HPLC/MS-аналізу показано здатність штамів *P. funiculosus* синтезувати біологічно активні гібереліни ГК₃, ГК₄ і ГК₇, що може відігравати важливу фізіологічну роль у формуванні ними симбіотичних та асоціативних взаємовідношень з рослинами.

Синтез гіберелінів ендofітним штамом *P. funiculosus* є важливою складовою формування мутуалістичних взаємовідносин з рослиною-хазяїном. Для штама-сапротрофа рівень і спектр синтезу гіберелінів також свідчить про встановлення певного формату взаємовідношень гриба з рослинним організмом. З іншого боку, відомо, що у ґрунтових біоценозах *P. funiculosus* синтезує речовини з антибактеріальними, антифунгальними і противірусними властивостями [20], що, у свою чергу, обумовлює його високу конкурентоздатність щодо інших мікроорганізмів і порівняно низьку фітостимулювальну активність. І в той же час сапротрофні ізоляти, що існують у ризосфері рослин, також продукують гібереліни, у результаті чого відбувається стимуляція росту рослин, зокрема, збільшується площа поверхні кореневої системи рослин і, відповідно, кількість корневих виділень, якими живиться гриб. У результаті тесту на загальну фітостимулювальну активність встановлено, що сапротроф у розведеннях 1:100 і 1:200 пригнічував накопичення біомаси проростками озимої пшениці, незначну стимуляцію виявлено при подальших розведеннях КФ цього штаму (рис. 1 б). На нашу думку, ефект інгібування росту гіпокотилів огірків за низьких розведень КФ сапротрофного штаму може бути пов'язаний із синтезом інших екзометаболітів і, в першу чергу, інших класів гормонів. Так, відомо, що за умов скотоморфогенезу внесення екзогенних гіберелінів активує транскрипційні фактори, що знижують активність генів, відповідальних за синтез ауксинів [3].

Гібереліни ендofітів за дії абіотичного стресу проявляють свою активність не лише у своїй «класичній» ролі стимуляторів росту і розвитку рослин, але й підвищують стійкість рослин до негативних факторів середовища шляхом модуляції імунної відповіді рослини [29]. Отже, у таких умовах гібереліни ендofітів швидше виконують роль сигнальних молекул у розгалуженій мережі взаємодії рослинних гормонів. Властивість ендofітних мікроміцетів синтезувати природні екзометаболіти із фітостимулювальною активністю може знайти своє застосування у сучасних «зелених» технологіях для підвищення загальної резистентності рослин до стресових факторів довкілля.

**Е.М. Юрьева¹, И.В. Драговоз¹, Н.О. Леонова¹, А.Н. Остапчук²,
М.А. Хархота¹, С.А. Сырчин¹, И.Н. Курченко¹**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного 154, Киев, 03143, Украина

²Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

ГИББЕРЕЛЛИНЫ ЭНДОФИТНОГО И САПРОТРОФНОГО ШТАММОВ *PENICILLIUM FUNICULOSUM*

Резюме

Цель. Исследование общей фитостимулирующей и гибберелловой активностей, а также качественного и количественного состава экстрацеллюлярных гиббереллинов эндофитного и сапротрофного штаммов *Penicillium funiculosum*. **Методы.** Микробиологические, физиологические и физико-химические (HPLC/MS) методы исследований. **Результаты.** Установлено, что фитостимулирующая активность штамма-эндофита *P. funiculosum* четко проявлялась в неразведенном культуральном фильтрате (КФ) и в разведениях 1:100 ÷ 1:500, тогда как у сапротрофа она была значительно ниже и наблюдалась только в определенных разведениях (1:400 и 1:500). В специфическом биотестировании на гибберелловую активность экстракт КФ эндофитного штамма был в три раза активнее по сравнению с сапротрофным – 30% и 10% соответственно. HPLC/MS анализ показал, что эндофит и сапротроф *P. funiculosum* синтезируют гиббереллины: ГК₃ (6,8 нг/г АСБ и 4,1 нг/г АСБ соответственно), ГК₄ (4,9 нг/г АСБ и 11,6 нг/г АСБ) и следовые количества ГК₇. **Выводы.** Исследованные эндофитный и сапротрофный штаммы *P. funiculosum* синтезируют биологически активные гиббереллины ГК₃, ГК₄ и ГК₇, что может играть важную физиологическую роль при формировании ими симбиотических и ассоциативных взаимоотношений с растениями.

Ключевые слова: *Penicillium funiculosum*, эндофиты, сапротрофы, гиббереллины, биотестирование, HPLC/MS.

**О.М. Yurieva¹, I.V. Dragovoz¹, N.O. Leonova¹, A.M. Ostapchuk²,
M.A. Kharkhota¹, S.O. Syrchin¹, I.M. Kurchenko¹**

¹D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
154, Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

²Odesa I.I. Mechnikov National University, 2, Dvoryanska St., Kyiv, 65082, Ukraine

GIBBERELLINS OF ENDOPHYTIC AND SAPROTROPHIC *PENICILLIUM FUSICULOSUM* STRAINS

Summary

Aim. Study of the general phytostimulating and gibberellic activities, as well as qualitative and quantitative composition of extracellular gibberellins of endophytic and saprotrophic *Penicillium funiculosum* strains. **Methods.** Microbiological, physiological and physico-chemical (HPLC/MS) research methods. **Results.** It was established that the phytostimulating activity of endophytic *P. funiculosum* strain was clearly indicated in undiluted culture filtrate (CF) and in 1: 100 ÷ 1: 500 dilutions, whereas for saprotroph it was significantly lower and was observed only at certain dilutions (1:400 and 1:500).

In specific gibberellic biotest the CF extract of endophytic strain was three times more active than saprotrophic one – 30% and 10%, respectively. HPLC/MS analysis showed that endophytic and saprotrophic *P. funiculosum* strains synthesize gibberellins: GA₃ (6.8 ng/g dw and 4.1 ng/g dw, respectively), GA₄ (4.9 ng/g dw and 11.6 ng/g dw) and trace amounts of GA₇. **Conclusions.** The studied endophytic and saprotrophic *P. funiculosum* strains were able to synthesize biologically active gibberellins GA₃, GA₄ and GA₇, that may play an important physiological role in the formation of symbiotic and associative relationships with plants.

Keywords: *Penicillium funiculosum*, endophyte, saprotroph, gibberellin, biotesting, HPLC/MS.

1. Albermann S, Elter T, Teubner A, Krischke W, Hirth T, Tudzynski B. Characterization of novel mutants with an altered gibberellin spectrum in comparison to different wild-type strains of *Fusarium fujikuroi*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(17):7779-90.
2. Bilai VI, editor. [Methods of experimental mycology: reference guide]. Kiev: Nauk. dumka; 1982. Russian.
3. Chapman EJ, Greenham K, Castillejo C, Sartor R, Bialy A, Sun TP, Estelle M. Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through GA-dependent and -independent pathways. *PLoS One.* 2012;7(5):e36210.
4. Davies PJ, editor. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht: Springer; 2004.
5. Dragovoz IV, Leonova NO, Zhukova DA, Avdeeva LV. [Phytostimulating activity of exometabolites of antagonistic *Bacillus amyloliquefaciens* strain IMV B-7404]. *Microbiology and Biotechnology.* 2013; 3:84-93. Ukrainian.
6. Hamayun M, Khan SA, Iqbal I, Ahmad B, Lee IJ. Isolation of a gibberellin-producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and growth promotion of crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*). *J Microbiol Biotechnol.* 2010; 20(1):202-7.
7. Hasan HAH. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Rostlinná Výroba.* 2002; 48(3):101-6.
8. Khan AL, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Al-Farsi Z, Al-Mamari A, Wagas M, et al. Endophytic fungi from Frankincense Tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic acid. *PLoS ONE.* 2016; 11(6):e0158207.
9. Khan AL, Hamayun M, Ahmad N, Waqas M, Kang SM, Kim YH, Lee IJ. *Exophiala* sp. LHL08 reprograms *Cucumis sativus* to higher growth under abiotic stresses. *Physiol Plant.* 2011; 143(4):329-43.
10. Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee IJ. Ameliorative symbiosis of endophyte (*Penicillium funiculosum* LHL06) under salt stress elevated plant growth of *Glycine max* L. *Plant Physiol Biochem.* 2011; 49(8):852-61.
11. Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee JH, Lee IJ. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochem.* 2011; 46(2):440-7.
12. Khan AL, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Jung HY, Lee JH, Lee IJ. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiol.* 2012; 12:3.

13. Khan SA, Hamayun M, Yoon HJ, Kim HY, Suh SJ, Hwang SK, Kim JM, Lee IJ, Choo YS, Yoon UH, et al. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. BMC Microbiol. 2008; 8:231-9.
14. Khan AL, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee IJ. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. Crit Rev Biotechnol. 2015; 35(1): 62-74.
15. Khan AL, Lee IJ. Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during cooper stress. BMC Plant Biology. 2013; 13:86.
16. Khan AL, Waqas M, Lee IJ. Resilience of *Penicillium resedanum* LK6 and exogenous gibberellin in improving *Capsicum annuum* growth under abiotic stresses. J Plant Res. 2015; 128(2): 259-68.
17. Kholodny Institute of Botany. [Guidelines on determination of plant hormones]. – Kyiv; 1988. Russian.
18. Kozlovsky AG, Zhelifonova VP, Antipova TV. Biologically active metabolites of *Penicillium* fungi. J Org Biomol Chem. 2013; 1:11-21.
19. Kurchenko IM. [Biodiversity, ecological and physiological peculiarities of endophytic micromycetes of sphagnum bog plants of Ukrainian Polissya]. Thesis for the degree of doctor of biological sciences by speciality 03.00.07 – microbiology. Kyiv, 2014. Ukrainian.
20. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. Chem Biol. 2012; 19(7):792-8.
21. Leitão AL, Enguita FJ. Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. Microbiol Res. 2016; 183:8-18.
22. MacMillan J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. J Plant Growth Regul. 2002; 20(4):387-442.
23. Malonek S, Bömke C, Bornberg-Bauer E, et al. Distribution of gibberellins biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Phytochemistry. 2005a; 66(11):1296-311.
24. Muromtsev GS, Agnistikova VN. [Gibberellins: Monograph]. Moscow; 1984. Russian.
25. Partida-Martínez LP, Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? Front Plant Sci. 2011; 100(2):1-16.
26. Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. Mycol. Res. 2005; 109(6):661-86.
27. The Gibberellins Annual plant reviews. Vol. 49 / edited by Hedden P., Thomas GS, eds. – Wiley Blackwell; 2016.
28. Troncoso C, Gonzalez X, Bomke C, Tudzynski B, Gong F, Hedden P, Rojas MC. Gibberellin biosynthesis and gibberellin oxidase activities in *Fusarium sacchari*, *Fusarium konzum* and *Fusarium subglutinans* strains. Phytochemistry. 2010; 71 (11-12):1322-31.
29. Verma V, Ravindran P, Kumar PP. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. BMC Plant Biology. 2016; 16:86.
30. Waqas M, Khan AL, Kamran M, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Lee IJ. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules. 2012; 17(9):10754-73.
31. You YH, Yoon H, Kang SM, Shin JH, Choo YS, Lee IJ, Lee JM, Kim JG. Fungal

- diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. *J Microbiol Biotechnol.* 2012; 22(11):1549-56.
32. *Yurieva OM, Gryganskyi AP, Syrchin SO, Nakonechna LT, Pavlychenko AK, Kurchenko IM.* [β -Glucosidase of endophytic and saprotrophic *Penicillium funiculosum* strains]. *Factors in experimental evolution of organisms.* 2017; 20 in press. Ukrainian.
33. *Yurieva OM, Kurchenko IM, Syrchin SO, Kharkevych OS, Pavlychenko AK, Nakonechna LT.* [Cellulase and xylanase activities of endophytic and soil *Penicillium funiculosum* strains]. *Mikrobiol Z.* 2016; 78(5):74-81. Ukrainian.

Отримано 15.12.2016.