

ОПТИМІЗАЦІЯ ВМІСТУ ФІТОГОРМОНІВ У БІОПРЕПАРАТАТІ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЇ РИЗОГУМІНІ

Комок М.С., Дімова С.Б., Волкогон В.В.

Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027
e-mail: rifam@ukrpost.ua

*Із застосуванням методу твердофазного імуноферментного аналізу визначено вміст індолілоцтової кислоти та цитокінінів у складових комплексного біопрепарату Ризогуміну – культуральній рідині *Bradyrhizobium japonicum* М 8 та екстракті біогумусу. На основі даних, отриманих у вегетаційному досліді з соєю, надано рекомендації щодо оптимізації вмісту зазначених фітогормонів у препараті.*

Ключові слова: ауксини, цитокініни, бульбочкові бактерії, соя, Ризогумін.

Бактеріальні препарати, при незаперечній екологічній і економічній доцільності їх застосування мають такий недолік, як нестабільність ефективності. Достовірну позитивну дію вони забезпечують лише у 60-70 % випадків їх використання [1, 2]. На ефективність препаратів можуть негативно вплинути несприятливі біологічні, абіотичні та антропогенні фактори. Тому актуальною є розробка комплексних мікробних препаратів, застосування яких у виробництві має різнобічний позитивний вплив на ріст і розвиток культурних рослин і значною мірою нівелює негативний ефект окремих чинників.

Одним із препаратів комплексної дії, що містить, окрім бактеріального компоненту, фізіологічно активні речовини (ФАР) біологічного походження, є Ризогумін. Додатковим джерелом ФАР у ньому є біогумус, приготовлений за спеціального режиму компостування. Оптимальна кількість фітогормонів позитивно впливає на нодуляційну здатність бобових рослин, нітрогеназну активність кореневих бульбочок, урожайність культур та стійкість рослин до фітопатогенів [3-5]. Водночас, надмірна кількість ФАР призводить до розбалансування в гормональній системі рослин, що веде до пригнічення їх розвитку. З огляду на це, оптимізація вмісту фітогормонів у мікробних препаратах змогла б забезпечити

стабільний та ефективний вплив біодобрив на розвиток іноккульованих рослин.

Метою роботи було визначення кількості фітогормонів у Ризогуміні, яка оптимально впливає на формування та ефективність соєво-ризобіального симбіозу.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були рослини сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Устя та бульбочкові бактерії сої *Bradyrhizobium japonicum* М 8 [6].

У досліді використано торф'яний препарат комплексної дії Ризогумін із різним вмістом індолілоцтової кислоти (ІОК) та цитокінінів. Вміст ІОК у складових біопрепарату (водному екстракті вермикомпосту та культуральній рідині бульбочкових бактерій сої) визначали за описаною раніше методикою твердофазного імуноферментного аналізу [7] із застосуванням попередньої екстракції та метилювання зразків. Готуючи зразки до аналізування методом ТІФА, після центрифугування аліквоту супернатанту (наприклад, 3 мл) розводили до об'єму 9 мл дистильованою водою, потім додаванням концентрованої соляної кислоти доводили рН розчину до 2-3. Після цього двічі проводили екстракцію діетиловим ефіром (по 3 мл), кожен раз відбираючи ефірну фракцію. До відібраної фракції, поміщеної в іншу пробірку, додавали 3 мл 1 %-ного розчину соди (Na_2CO_3), перемішували та ефірну фракцію відкидали. Отриману содову фракцію підкислювали до рН 2-3 концентрованою HCl , потім знову двічі проводили екстракцію діетиловим ефіром (по 1,5 мл). Метилювання зразків проводили діазометаном. Для цього ефірну фракцію, одержану після екстракції, збирали в конічну пробірку, до неї додавали 5 мл ефірного розчину діазометану, одержаного з синтезованої N-нітрозометилсечовини [8], після чого зразки залишали випаровуватися до сухого стану при кімнатній температурі у витяжній шафі. Перед визначенням вмісту ІОК методом ТІФА зразки змивали 80-100 мкл 80 %-ного етилового спирту та 10 мкл вносили в лунку полістиролових планшетів при імуноферментному аналізі.

При визначенні вмісту цитокінінів у складових Ризогуміну використано відому методику отримання імуноферментної аналітичної тест-системи, призначеної для визначення кількісного вмісту цитокінінів у рослинному матеріалі, яка дає можливість визначати сумарний вміст двох форм цитокінінів – зеатину та зеатинрибозиду [9]. Суспензію досліджуваних бактерій та

витяжки біогумусу перед аналізуванням на вміст зеатиноподібних фітогормонів методом ТФА центрифугували при 8 тис. об./хв. 10 хвилин. Супернатант підкислювали концентрованою соляною кислотою до рН 2,8 і тричі екстрагували етиловим ефіром оцтової кислоти. Водну фракцію, доведену 1 н NaOH до рН 7,0, тричі екстрагували *n*-бутанолом. Потім бутанольну фракцію упарювали під вакуумом за температури +40-45 °С. Сухий залишок розчиняли в 1,5 мл етилового спирту (96 %), переносили в пробірки та зберігали в морозильній камері (-18 °С). Отримані екстракти очищували шляхом хроматографування на пластинках із силікагелем (Merck 1.05554.0001, F₂₅₄, Німеччина) у різних системах розчинників [10].

Культуру бульбочкових бактерій вирощували протягом 3 діб при 28 °С на середовищі такого складу (г/л): сахароза – 2,0; маніт – 3,0; глюкоза – 10,0; (NH₄)₂SO₄ – 1,0; KH₂PO₄ – 0,5; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄·7 H₂O – 0,2; CaCO₃ (стерилізований) – 0,1; (NH₄)₂MoO₄ – 0,05; 150 мл люпинового відвару, рН 6,8–7,0. Для виготовлення біопрепаратів використовували бактеріальну суспензію з титром 2×10⁹ клітин/мл.

Вплив різних доз ФАР на формування та ефективність бобово-ризобіального симбіозу вивчали в умовах вегетаційного досліду. Насіння сої сорту Устя перед посівом поверхнево стерилізували у 96 % розчині етилового спирту протягом 10 хвилин і пророщували. Інокуляцію проростків проводили експериментальними препаратами, до складу яких входила водна витяжка біогумусу з різним вмістом фітогормонів (що був попередньо визначений методом твердофазного імуноферментного аналізу) та суспензія *B. japonicum*. Досліджувані препарати містили фітогормони ауксинової природи (ІОК) в межах від 0,55 мкг/г до 18,52 мкг/г препарату, а речовини цитокінінової природи (зеатин+зеатинрибозид) – від 0,20 мкг/г до 3,88 мкг/г препарату. Контролями були варіанти з обробкою насіння водою та інокуляцією суспензією *B. japonicum* М 8 (вміст ауксинів – 1,7 мкг/мл, цитокінінів – 0,9 мкг/мл).

Рослини сої вирощували на чорноземі вилугуваному (рН_{сол.} – 5,2; вміст гумусу – 3,01 %; вміст азоту, що легко гідролізується, – 109 мг/кг ґрунту; вміст P₂O₅ – 168 мг/кг ґрунту; вміст K₂O – 58 мг/кг ґрунту) у пластикових посудинах ємністю 1,5 л. У субстрат вносили суміш Прянішнікова з вмістом азоту 0,2 норми. Вологість субстрату протягом періоду вирощування підтримува-

ли на рівні 60 % від повної вологоємності. У кожній посудині вирощували по чотири рослини. Повторність дослідів – чотирикратна.

Біометричні дослідження проводили за використання відповідних методик [11, 12]. Вивчення активності симбіотичної азотфіксації проводили методом редукції ацетилену на газовому хроматографі Chrom-4 [13]. Вміст хлорофілу визначали спектрофотометричним методом [14]. Вміст водорозчинного білка досліджували методом Лоурі [15]. Активність глутамінсинтетази – за відповідною методикою [16]. Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали згідно існуючих рекомендацій [11].

Результати та їх обговорення. Всі експериментальні варіанти препарату забезпечували достовірний приріст кількості бульбочок у порівнянні з контролем без бактеризації (табл. 1). Водночас, у порівнянні з показниками варіанту з інокуляцією насіння сої бактеріальною суспензією, позитивний вплив мали препарати із вмістом ауксинів 9,39 мкг/г та 4,57 мкг/г і цитокінінів – 2,01 мкг/г і 1,08 мкг/г. У цих варіантах спостерігали збільшення кількості бульбочок на 33,3 % і 34,5 %, відповідно. Дія різних інокулянтів сприяла достовірному збільшенню маси бульбочок (табл. 1). По відношенню до показників маси бульбочок у варіанті з застосуванням бактеріальної суспензії позитивний приріст забезпечував препарат, що містив 4,83 мкг/г ауксинів і 1,08 мкг/г цитокінінів. При дослідженні азотфіксувальної активності симбіотичної системи встановлено, що лише три варіанти препарату, із вмістом ауксинів у межах від 2,55 мкг/г до 9,39 мкг/г і цитокінінів – від 0,61 мкг/г до 2,01 мкг/г, забезпечували достовірний приріст по відношенню до показників позитивного контролю (табл. 1). У цих варіантах досліді спостерігали збільшення нітрогеназної активності на 29,4 % – 50,1 %.

Визначення симбіотичних показників у ході тестування свідчить про позитивну дію експериментальних препаратів із вмістом ауксинів 9,39 мкг/г та 4,83 мкг/г і цитокінінів – 2,01 мкг/г і 1,08 мкг/г.

При визначенні впливу експериментальних препаратів на ріст та накопичення біомаси рослин сої встановлено, що їх застосування сприяло достовірному збільшенню довжини стебел рослин сої у порівнянні з показниками рослин контрольного варіанту. По відношенню до даних варіанту з обробкою насіння бактеріальною

суспензією достовірний приріст довжини стебел спостерігали за дії препаратів із вмістом ауксинів у межах від 0,55 мкг/г до 9,39 мкг/г і цитокінінів – від 0,20 мкг/г до 1,08 мкг/г (табл. 2).

Таблиця 1. Вплив експериментальних препаратів на формування та активність соєво-ризобіального симбіозу

Варіанти досліджу	Навантаження ФАР на насінину, ауксини/цитокініни, 10 ⁻³ мкг/насінину	Кількість бульбочок на корінні, од./рослину	Маса бульбочок, г/рослину	Нітрогеназна активність, нмоль C ₂ H ₄ /рослину
Контроль	–	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Бактеріальна суспензія	0,13/0,06	17,7±2,5	0,16±0,02	324,13±50,97
Експериментальні препарати, що містять ауксинів/цитокінінів, мкг/г:				
18,52/3,88	5,74/1,20	17,0±1,3	0,12±0,01	284,41±48,48
9,39/2,01	2,95/0,62	23,6±2,4	0,19±0,02	419,47±35,98
4,83/1,08	1,49/0,33	23,8±1,6	0,21±0,01	486,20±47,03
2,55/0,61	0,79/0,19	21,3±3,3	0,17±0,01	457,60±47,04
1,41/0,38	0,44/0,12	18,3±1,9	0,18±0,03	374,98±35,92
0,94/0,26	0,29/0,08	20,3±5,2	0,17±0,01	338,43±42,99
0,55/0,20	0,17/0,06	18,4±2,5	0,18±0,03	362,27±21,49

Примітка: тут і далі жирним шрифтом виділено показники, що достовірно відрізняються від контрольних

Дослідження впливу біопрепаратів на накопичення надземної маси рослин свідчить про позитивну їх дію за вмісту ауксинів 9,39 мкг/г та 4,83 мкг/г і цитокінінів – 2,08 мкг/г і 0,94 мкг/г (табл. 2). Дія цих інокулянтів забезпечувала приріст сухої надземної маси на 20,9 % і 13,2 %, відповідно.

При вивченні впливу експериментальних інокулянтів на формування маси коренів встановлено, що варіанти за цим показником достовірно не відрізнялися.

Дослідження вмісту хлорофілів у листках рослин сої у ході тестування свідчить про зростання вмісту хлорофілу *a* в усіх варіантах з інокуляцією (табл. 3). Найбільші показники спостерігали у варіанті із застосуванням експериментальних препаратів із вмістом ауксинів у межах від 2,55 мкг/г до 9,39 мкг/г і цитокінінів – від

0,61 мкг/г до 2,01 мкг/г. У цих варіантах спостерігали перевищення контрольних показників на 20,4 %, 23,3 % та 21,5 %, відповідно. За вмістом хлорофілу *b* варіанти достовірно не відрізнялися. Достовірний приріст суми хлорофілів забезпечували лише три експериментальні біопрепарати із вмістом ауксинів від 2,55 мкг/г до 9,39 мкг/г і цитокінінів – від 0,61 мкг/г до 2,01 мкг/г (табл. 3).

Таблиця 2. Вплив експериментальних препаратів на ріст та формування вегетативної маси рослин сої

Варіанти досліджу	Навантаження ФАР на насінину, ауксини/цитокініни, 10 ⁻³ мкг/насінину	Висота рослин, см	Маса рослин, г/рослину	Маса коренів, г/рослину
Контроль	–	34,0±2,6	0,84±0,04	0,18±0,06
Бактеріальна суспензія	0,13/0,06	37,4±3,2	0,91±0,04	0,21±0,04
Експериментальні препарати, що містять ауксинів/цитокінінів, мкг/г:				
18,52/3,88	5,74/1,20	41,9±3,9	0,89±0,06	0,21±0,01
9,39/2,01	2,95/0,62	48,6±5,1	1,10±0,08	0,26±0,03
4,83/1,08	1,49/0,33	52,9±4,2	1,03±0,04	0,25±0,03
2,55/0,61	0,79/0,19	53,1±5,5	0,95±0,03	0,22±0,03
1,41/0,38	0,44/0,12	49,6±4,0	0,92±0,06	0,23±0,01
0,94/0,26	0,29/0,08	46,9±4,9	0,96±0,07	0,22±0,02
0,55/0,20	0,17/0,06	50,2±3,8	0,93±0,05	0,25±0,04

Фітогормони, особливо цитокінінової природи, підвищуючи активність ферментів азотного циклу, позитивно впливають на азотний обмін рослин. У ході тестування відзначали достовірне підвищення активності глутамінсинтетази у варіантах з інокуляцією (табл. 4). Найвищі показники активності ферменту спостерігали у варіантах з використанням експериментальних інокулянтів із вмістом ауксинів від 2,55 мкг/г до 9,39 мкг/г і цитокінінів – від 0,67 мкг/г до 2,01 мкг/г. Відповідно, в усіх варіантах з інокуляцією відмічено достовірне підвищення вмісту водорозчинного білка в листках сої у межах від 0,63 % до 1,66 % у порівнянні з контрольними показниками. Проте найвищі показники спостерігали при застосуванні експериментальних препаратів, які забезпечили найбільшу активність глутамінсинтетази.

Таблиця 3. Вплив експериментальних препаратів на вміст хлорофілів *a* і *b* в листках сої

Варіанти дослідів	Навантаження ФАР на насінину, ауксини/цитокініни, 10 ⁻³ мкг/насінину	Хлорофіл, мг/100 г листкової маси		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>
Контроль	–	156,37±9,08	40,52±8,94	196,89±8,74
Бактеріальна суспензія	0,13/0,06	163,74±8,60	27,64±7,27	191,38±7,74
Експериментальні препарати, що містять ауксинів/цитокінінів, мкг /г:				
18,52/3,88	5,74/1,20	170,97±9,60	38,68±17,92	209,66±8,58
9,39/2,01	2,95/0,62	188,23±4,32	32,19±4,52	220,42±8,83
4,83/1,08	1,49/0,33	192,79±4,19	36,98±19,37	229,78±19,94
2,55/0,61	0,79/0,19	190,01±6,21	36,13±14,27	226,14±10,48
1,41/0,38	0,44/0,12	179,96±9,12	30,25±15,95	210,20±24,43
0,94/0,26	0,29/0,08	167,08±7,56	36,19±4,20	203,26±5,84
0,55/0,20	0,17/0,06	176,58±8,42	42,18±10,89	218,76±20,96

Таблиця 4. Вплив експериментальних препаратів на азотний обмін рослин сої

Варіанти дослідів	Навантаження ФАР на насінину, ауксини/цитокініни 10 ⁻³ мкг/насінину	Активність глутамінсинтетази, (мкмоль Р/(мг•хв))	Вміст водорозчинного білка в листках	
			мг/г	%
Контроль	–	3,55±0,49	46,25±3,23	4,63±0,32
Бактеріальна суспензія	0,13/0,06	5,34±1,48	53,79±3,28	5,38±0,33
Експериментальні препарати, що містять ауксинів/цитокінінів, мкг /г:				
18,52/3,88	5,74/1,20	5,39±1,26	52,62±1,39	5,26±0,14
9,39/2,01	2,95/0,62	6,48±1,04	60,08±1,28	6,01±0,13
4,83/1,08	1,49/0,33	6,88±1,02	62,94±1,68	6,29±0,17
2,55/0,61	0,79/0,19	6,46±0,96	60,29±1,84	6,03±0,18
1,41/0,38	0,44/0,12	6,08±0,34	57,51±1,35	5,75±0,14
0,94/0,26	0,29/0,08	5,83±0,72	55,17±2,48	5,52±0,25
0,55/0,20	0,17/0,06	5,50±0,83	56,27±2,40	5,63±0,24

Таким чином, методом твердофазного імуноферментного аналізу досліджено вміст індолілоцтової кислоти та цитокінінів у культуральній рідині бульбочкових бактерій сої та водному екстракті біогумусу. Встановлено, що експериментальний препарат Ризогумін, що містив, крім бактеріальної суспензії, 4,83 мкг/г ауксинів і 1,08 мкг/г цитокінінів, проявляв найбільшу стимулювальну дію щодо формування та функціонування рослинно-бактеріального симбіозу. У варіанті із застосуванням цього інокулянту спостерігали значне підвищення нодуляційної здатності ризобій сої, нітрогеназної активності бульбочок, активності глутамінсинтетази, вмісту суми хлорофілів та водорозчинного білка в листках дослідних рослин. Регулюючи вміст екзогенних фітогормонів, зокрема, ІОК і цитокінінів, у препаратах можна суттєво підвищити їх ефективність.

1. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе /А.В. Хотянович. – Л., 1991. – 60 с.

2. Okon Y. Field inoculation of grasses with *Azospirillum* /Y. Okon //Biological nitrogen fixation in tropical agriculture. – 1982. – P. 459-467.

3. Симбіотичні властивості *Bradyrhizobium japonicum* 6346 за дії фіторегулятора Reglgalg /[О.В. Кириченко, Л.В. Титова, А.В. Жеймода та ін.] //Мікробіол. журн. – 2008 – Т. 70, № 1. – С. 17–25.

4. Ефективність нового біологічного препарату ризогуміну для сої /[В.В. Волкогон, Н.П. Штанько, В.П. Сальник та ін.] //Селекція і насінництво. міжвід. тем. зб. – 2005. – № 90. – С. 254-259.

5. Вплив регуляторів росту на розвиток бактеріальних хвороб сої /[М.С. Корнійчук, С.В. Поліщук, Л.Г. Жмурко та ін.] //С.-г. мікробіологія: міжвід. тем. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2008. – Вип. 7. – С. 138-147.

6. Пат. UA 39545 А, 7С12N1/20, С05F11/08. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М 8, який використовують для виготовлення бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої /Толкачов М.З., Патики В.П., Каменєва І.О., Грітчина Л.Ю.; заявник і патентовласник Південний філіал Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.– № 200105680; заявл. 06.10.00; опубл. 15.06.01, Бюл. № 5.

7. Імуноферментне визначення вмісту індолілоцтової кислоти в культуральній рідині мікроорганізмів /С.Б. Дімова, О.О. Дмитрук, О.Є. Мамчур, Л.П. Коломієць, В.В. Волкогон //С.-г. мікробіологія: міжвід. тем. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2009. – Вип. 9. – С. 179-187.

8. Определение остаточных количеств мезотонина в воде, почве,

зелёной массе и зерне кукурузы методом газожидкостной хроматографии. Методические указания. МУК 4.1.1393-03 (Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 24.06.2003).

9. Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов /[Г.Р. Кудоярова, С.Ю. Веселов, Н.Н. Каравайко и др.] //Физиол. раст. – 1990. – Т. 37, Вып. 1. – С. 193–199.

10. Савинский С.В. Определение зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии /С.В. Савинский, И.В. Драговоз, В.К. Педченко //Физиол. и биохим. культ. раст. – 1991. – Т. 23, № 6. – С. 606-614.

11. Доспехов В.А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований. /В.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

12. Посыпанов Г.С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха: Справочное пособие /Г.С. Посыпанов. – М.: Агропромиздат, 1991. – 300 с.

13. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation /[R.W.F. Hardy, R.D. Holsten, E.K. Jackson et al.] //Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, № 8. – P. 1185-1207.

14. Гродзинский А.М. Краткий справочник по физиологии растений /А.М. Гродзинский, Д.М. Гродзинский. – К.: Наукова думка, 1973. – 592 с.

15. Агрохімічний аналіз /[М.М. Городній, А.П. Лісовал та ін.]: Підручник. – К., 2005. – С. 299-302.

16. Евстигнеева З.Г. Определение активности глутаминсинтетазы /З.Г. Евстигнеева, Е.Г. Громыко, К.Б. Асеева //Биохимические методы. – М.: Наука, 1980. – С. 84-86.

ОПТИМИЗАЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФИТОГОРМОНОВ В БИОПРЕПАРАТЕ КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ РИЗОГУМИНЕ

Комок М.С., Димова С.Б., Волкогон В.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины,
г. Чернигов

*С применением метода твердофазного иммуноферментного анализа определено содержание индолилуксусной кислоты и цитокининов в составляющих комплексного биопрепарата Ризогумина – культуральной жидкости *Bradyrhizobium japonicum* М 8 и экстракте биогуруса. На основании данных, полученных в вегетационном опыте с соей, даны рекомендации по оптимизации содержания указанных фитогормонов в препарате.*

Ключевые слова: ауксины, цитокинины, клубеньковые бактерии, соя, Ризогумин.

OPTIMIZATION OF PHYTOHORMONES CONTENTS IN COMPLEX BIOPREPARATION RHIZOHUMIN

Komok M.S., Dimova S.B., Volkogon V.V.

Institute of Agricultural Microbiology, NAAS of Ukraine, Chernihiv

*By application of the ELISA method the content of indolylacetic acid and cytokinins in the extracts of vermicompost and bacterial suspension of *Bradyrhizobium japonicum* M 8 (components of complex biopreparation Rhizohumin) was determined. Basing on the data obtained in the greenhouse experiments with soybean plants, the recommendations for content of these phytohormones in the preparation optimization was done.*

Key words: auxins, cytokinins, root nodule bacteria, soybeans, Rhizohumin.