

УДК 581.1

ГОРМОНАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ АССОЦИАЦИЕЙ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ РИЗОСФЕРЫ ЖЕНЬШЕНЯ

И.В. ДРАГОВОЗ, В.К. ЯВОРСКАЯ, В.П. АНТОНЮК, Б.А. КУРЧИЙ

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Исследовали содержание природных гормональных соединений, продуцируемых ассоциацией микроорганизмов, полученных из ризосферы женьшеня, а также влияние метаболитов среды культивирования этой ассоциации, экстрактов из биомассы микроорганизмов ассоциации на рост растений озимой пшеницы. Установлено, что ассоциация продуцирует индолилуксусную, гибберелловую, абсцизовую кислоты, а также холестерол и 24-эпибрассинолид. Показана высокая ростстимулирующая активность как культуральной среды, так и экстрактов из биомассы микроорганизмов.

Ключевые слова: ассоциация микроорганизмов, биотестирование, фитогормоны, холестерол, 24-эпибрассинолид, ростстимулирующая активность.

Рост и развитие растений регулируются большим количеством экзогенных и эндогенных факторов. К последним можно отнести ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен, абсцизовую и жасмоновую кислоты, brassinosteroids и др.

Исследования стероидных соединений в растениях, в частности brassinosteroids, представляют значительный интерес. В зависимости от наличия алкильных групп стероиды растительного происхождения при C—24 боковой цепи 5 α -холестан углеродного скелета классифицируют как C—27-, C—28- и C—29-брасиностероиды. В биотестах сверхнизкие концентрации брасинолидов проявляют значительно бóльшую активность по сравнению с индолил- и нафтилуксусной кислотами [5]. Brassinosteroids могут влиять на широкий спектр клеточных реакций: стимулировать рост пыльцевых трубок, изменять форму листьев растений, ингибировать рост корней, стимулировать выделение этилена, активировать протонную помпу и дифференциацию ксилемы, стимулировать экспрессию генов [6, 18]. Описано стимулирующее действие 24-эпибрассинолида на соматический эмбриогенез гималайской голубой сосны [17]. Эти соединения повышали также устойчивость растений к абиотическим стрессам и фитопатогенам [13–15].

Получение и использование в практике растениеводства природных гормональных соединений является актуальной задачей, особенно в связи с абиотическими стрессами, опасность которых возрастает в связи с изменениями климата. Среди природных источников гормональных соединений особое место принадлежит грибам, в частности микромицетам. Так, один из представителей исследуемой ассоциации гриб рода

Acromonium, продуцирует значительное количество биологически активных веществ, в том числе амфотерицин В, миконазол, итраконазол, флуконазол, кетаконазол, 5-флуороцитозин [11], циклоспорин [12], индолилукусную кислоту [13].

Однако количество микроорганизмов, продуцирующих биологически активные вещества, значительно больше. Известно, что женьшень, в частности *Korean ginseng*, обладает широким спектром биологического действия не только благодаря синтезу биологически активных веществ собственно растением, но и в значительной степени — специфической ассоциации микроорганизмов на корневой системе [22]. Экстракты из ассоциации микроорганизмов корневой системы, имеющие высокую биологическую активность, могут влиять на растительные и животные организмы [1, 4]. В то же время данных о наличии регуляторов роста растений в составе экстрактов в литературе не представлено.

Целью наших исследований было изучение содержания и активности гормональных веществ, продуцируемых ассоциацией микроорганизмов, полученных из ризосферы женьшеня.

Методика

Ассоциацию микроорганизмов, выделенную из ризосферы женьшеня, культивировали в жидкой среде, разработанной для выращивания ассоциации микроорганизмов из ризосферы женьшеня [1].

В состав среды входили, г/л: глюкоза — 20; соевая мука — 12; дрожжевой автолизат — 3,0; кукурузный экстракт — 3,0 (мл/л); CaCO_3 — 4,5; K_2HPO_4 — 0,3; pH 6,8—7,0 (доводили 5 н раствором КОН), стерилизовали при 0,75 атм в течение 20 мин.

Среду готовили следующим образом: соевую муку заливали 1 л холодной водопроводной воды и кипятили 30 мин, постоянно помешивая. Жидкость охлаждали и фильтровали через несколько слоев марли. Затем в жидкости растворяли дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт и K_2HPO_4 . CaCO_3 взвешивали, помещали в стерильную посуду и заливали подготовленным раствором. 50 %-ю глюкозу готовили отдельно разбавлением в дистиллированной воде и стерилизацией при 0,5 атм. Затем ее непосредственно перед посевом добавляли в среду.

С целью исследования ростстимулирующей активности готовили фитогормональный препарат. Для этого среду фильтровали на воронке Бюхнера через капроновые и бумажные фильтры непосредственно перед проведением анализа. Чтобы увеличить скорость фильтрации, применяли вакуумирование. В процессе фильтрации использовали один капроновый и два бумажных фильтра.

Определение ИУК, ГК₃ и АБК. Жидкую среду культивирования ассоциации упаривали под вакуумом при 45 °С. Вещества из сухого остатка трижды экстрагировали смесью диэтиловый эфир/этилацетат (1:1), подкисленной соляной кислотой до pH 3,0. Полученный экстракт упаривали под вакуумом при 45 °С. Соединения определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Колонка С18, несущая фаза ацетонитрил/вода (65:35 об/об). Идентификацию веществ при 260 нм [6] осуществляли на основе сравнения времени удерживания аутентичных стандартов. Кроме того, тест на ауксины проводили на колеоптилях пшеницы сорта Альбатрос одесский, а на гиббереллины — на гипокотылях огурца сорта Нежинский (по их удлинению) согласно Муромцеву и соавт. [2].

Определение цитокининов. Жидкую среду культивирования ассоциации упаривали под вакуумом при 45 °С. Вещества из сухого остатка экстрагировали *n*-бутанолом, подщелоченным NaOH до pH 8,0. Экстракцию повторяли трижды. Полученный экстракт упаривали под вакуумом при 45 °С. Соединения определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Колонка C18, несущая фаза ацетонитрил/10 mM ацетата аммония (9:1 об/об). Идентификацию веществ при 210 и 260 нм осуществляли на основе совпадения времен удерживания аутентичных стандартов. Тест на цитокинины проводили также на изолированных семядолях огурца сорта Нежинский.

Тонкослойная хроматография. Очистку и идентификацию фитогормонов для высокоэффективной жидкостной хроматографии проводили согласно методике Савинского и соавт. [3].

Определение соединений стероидной природы. Жидкую среду культивирования ассоциации центрифугировали при 0 °С при 15 000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость упаривали досуха под вакуумом при 45 °С. Из сухого остатка стероиды трижды экстрагировали смесью ацетонитрил/этилацетат (1:1 об/об). Экстракты упаривали досуха под вакуумом. Стероидные соединения определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Колонка C18, несущая фаза ацетонитрил/20 mM K₂HPO₄ (pH 4,5) (6 : 4 об/об), скорость подвижной фазы 0,1 мл/мин. Идентификацию веществ при 210 нм [10] осуществляли, используя образцы известных препаратов.

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют, что культуральная среда исследуемой ассоциации обладала ауксиновой (табл. 1) и цитокининовой (табл. 2) активностями.

Обнаружено (см. табл. 1) два пика активности: первый — в неразбавленной водой среде, второй — при разбавлении культуральной среды в 300 раз, что может быть обусловлено наличием в среде индольных соединений различного строения и, следовательно, биологической активности. Это также может быть вызвано наличием в среде фенольных соединений, ингибирующая активность которых резко снижается при разбавлении (снижении концентрации). В то же время цитокининовая

ТАБЛИЦА 1. Ауксиновая активность культуральной среды ассоциации микроорганизмов, полученных из ризосферы женьшеня

Вариант	Длина coleoptилей, мм	% к контролю
Контроль	9,7 ± 0,3	100,0
ИУК, 10 ⁻⁵ М	11,6 ± 0,2	120,2
Культуральная среда, не разбавленная водой	11,4 ± 0,4	117,8
Культуральная среда, 1:10	10,3 ± 0,3	106,8
Культуральная среда, 1:50	9,8 ± 0,2	101,4
Культуральная среда, 1:100	9,3 ± 0,2	96,5
Культуральная среда, 1:150	10,2 ± 0,2	105,1
Культуральная среда, 1:200	9,9 ± 0,2	102,5
Культуральная среда, 1:300	12,2 ± 2,9	126,3

ТАБЛИЦА 2. Цитокининовая активность культуральной среды ассоциации микроорганизмов, полученных из ризосферы женьшеня

Вариант	Масса семядоли, мг сырого вещества	% к контролю
Контроль	0,045 ± 0,008	100,0
БАП, 10 ⁻⁵ М	0,075 ± 0,012	164,7
Культуральная среда, не разбавленная водой	0,053 ± 0,026	116,2
Культуральная среда, 1:10	0,057 ± 0,005	126,5
Культуральная среда, 1:50	0,051 ± 0,002	112,5
Культуральная среда, 1:100	0,065 ± 0,014	142,6

ТАБЛИЦА 3. Гиббереллиновая активность культуральной среды ассоциации микроорганизмов в тесте с гипокотиллями огурца сорта Нежинский

Вариант	Длина гипокотыля, мм	% к контролю
Контроль	32,5 ± 0,8	100,0
ГК ₃ , 50 мкг/мл	36,4 ± 1,2	111,8
Культуральная среда, не разбавленная водой	32,6 ± 1,2	100,2
Культуральная среда, 1:10	39,5 ± 1,3	121,5
Культуральная среда, 1:50	49,9 ± 15,2	153,4
Культуральная среда, 1:100	29,9 ± 1,1	92,0
Культуральная среда, 1:150	28,7 ± 0,9	88,3
Культуральная среда, 1:200	35,0 ± 1,5	107,7

активность проявлялась в довольно широком диапазоне разбавлений культуральной среды (0 — 1:100, см. табл. 2).

В тестах на гиббереллины активность обнаружена в диапазоне разбавлений культуральной среды 0 — 1:200 (табл. 3). Известно, что в суммарном количественном отношении содержание различных гиббереллинов значительно выше у грибов, чем у высших растений [2].

Проведен также анализ природных регуляторов роста в культуральной среде и биомассе ассоциации микроорганизмов (табл. 4). Как культуральная среда, так и биомасса микроорганизмов содержали ИУК, АБК и ГК₃. Зеатин был обнаружен только в культуральной среде, а соединения стероидной природы, в частности холестерол и 24-эпибрассинолид — в культуральной среде и биомассе микроорганизмов.

ТАБЛИЦА 4. Содержание фитогормонов в культуральной среде и биомассе микроорганизмов, выделенных из ризосферы женьшеня, мг/л

Вариант	ИУК	АБК	ГК ₃	Зеатин	Зеатин-рибозид	Холестерол	24-эпибрассинолид
Культуральная среда	0,0033	0,00026	0,0641	0,00023	Следы	0,238	0,0076
Биомасса микроорганизмов (спиртовый экстракт)	0,235	0,070	0,081	Следы	Следы	0,00008	0,336
Биомасса микроорганизмов (мг/г сырого вещества)	0,4272	0,1272	0,1472	Следы	Следы	0,00014	0,6109

ГОРМОНАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

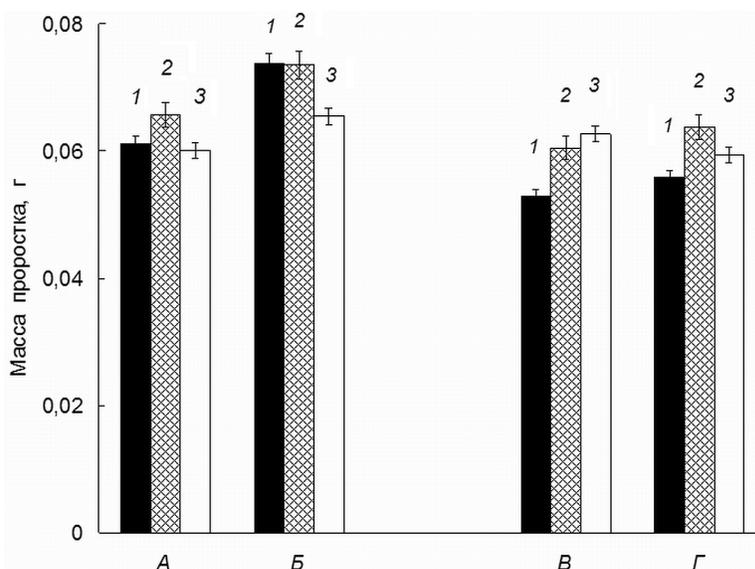
ТАБЛИЦА 5. Влияние ИУК, эпин-экстра и культуральной среды ассоциации микроорганизмов на рост корней кресс-салата сорта *Lola Rossa*, мм

Вариант	Длина корней, мм	% к контролю
Контроль	10,2 ± 0,6	100,0
ИУК, 10 ⁻⁴ М	8,7 ± 0,4	85,9
ИУК, 10 ⁻¹¹ М	10,2 ± 0,3	100,2
Эпин-экстра, 10 ⁻¹¹ М	13,2 ± 0,6	129,5
Культуральная среда, 1:1000	10,3 ± 0,4	101,3
Культуральная среда, 1:1200	14,2 ± 0,6	139,7
Культуральная среда, 1:2000	11,4 ± 0,6	112,1
Культуральная среда, 1:5000	10,5 ± 0,4	103,3

Таким образом, наличие холестерина в среде может свидетельствовать о его важной роли при синтезе 24-эпибрассинолида [18, 22].

Наличие brassinosteroidов подтверждено и методом биотестов на корнях проростков кресс-салата (табл. 5). При этом как эпин-экстра, так и экстракт ассоциации микроорганизмов (разбавление 1:1200 – 1:5000) давали четкую реакцию на наличие brassinoliда.

Суммарную биологическую активность экстрактов из ассоциации микроорганизмов, выделенных из ризосферы женьшеня, мы изучали на проростках двух сортов озимой пшеницы Киевская 8 и Альбатрос одесский (рисунок), которые различаются устойчивостью к действию биотических и абиотических факторов. Препарат в очень низкой концентрации (разбавление исходного 10⁻⁸ и 10⁻⁹) стимулировал рост как корневой, так и надземной частей проростков. На рисунке представлены данные только о действии препарата в ростстимулирующих концентрациях. При



Влияние экстрактов из ассоциации микроорганизмов, выделенных из ризосферы женьшеня, на рост проростков пшеницы сортов Киевская 8 (А, Б) и Альбатрос одесский (В, Г):

А, В – надземная часть; Б, Г – корни; 1 – контроль; 2 – экстракт, разбавление 10⁻⁸; 3 – экстракт, разбавление 10⁻⁹

дальнейшем разбавлении биологического действия препарата не обнаружено. В более высоких концентрациях препарат оказывал ингибирующее действие.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что ассоциация микроорганизмов, выделенных из ризосферы женьшеня, является эффективным продуцентом фитогормонов ауксиновой, гиббереллиновой и цитокининовой природы. Кроме того, она способна продуцировать 24-эпибрасинолид, а также холестерол, который является его предшественником. Совместное действие этих гормональных соединений подтверждает высокую биологическую активность экстрактов из ассоциации микроорганизмов, выделенных из ризосферы женьшеня.

Исследования других авторов также свидетельствуют о значительной биологической активности брассиностероидов в диапазоне малых концентраций. Последние представляют собой группу природных стероидных лактонов, включающих брасинолид и его аналоги. Так, в ряде экспериментов показано, что они положительно влияют на деление, растяжение и дифференциацию растительных клеток [7, 15, 19]. 24-эпибрасинолид инициирует эмбриогенез тканей хвойных и риса [20], органоогенез сладкого перца [9] и цветной капусты [21].

Результаты проведенных нами исследований могут быть использованы для создания комплексных регуляторов роста, которые содержат как экстракты из биомассы микроорганизмов, так и другие компоненты, дополнительно усиливающие их биологическую активность, в частности, макро- и микроэлементы.

1. Волова Т.Г. Биотехнология. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. — 252 с.
2. Муромцев Г.С., Агнестикова В.Н. Гиббереллины. — М.: Наука, 1984. — 208 с.
3. Савинский С.В., Драгозов И.В., Педченко В.К. Определение содержания зеатина, индол-3-уксусной и абсцизовой кислот в одной растительной пробе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. — 1991. — 23, № 6. — С. 611—619.
4. Топурия Л.Ю., Топурия Г.М. Влияние препаратов природного происхождения на воспроизводительную способность и иммунный статус коров // Вестн. Алтайск. гос. аграр. ун-та. — 2007. — 5 (31). — С. 21—27.
5. Brasa D. Biological effects of brassinosteroids // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. — 1999. — 34. — P. 339—358.
6. Cano-Delgado A., Yin Y., Yu C. et al. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis* // Development. — 2000. — 131. — P. 5341—5351.
7. Clouse S.D., Sasse J.M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1998. — 49. — P. 427—451.
8. De Almeida J. A. S., Kascheres C., de Fótima Pereira M. D.A. Ethylene and abscisic acid in the control of development of the rhizome of *Kohleria eriantha* (Benth.) Hanst. (Gesneriaceae) // Braz. J. Plant Physiol. — 2005. — 17, N 4. — P. 391—399.
9. Franck-Duchenne M., Wang Y., Tahar S.B., Beachy R.N. In vitro stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 1998. — 53. — P. 79—84.
10. Gamoh K., Yamaguchi I., Takatsuto S. Rapid and selective sample preparation for the chromatographic determination of brassinosteroids from plant material using solid-phase extraction method // Analyt. Sci. — 1994. — 10. — P. 913—917.
11. Guarro J., Gams W., Pujol I., Gene J. *Acremonium* species: new emerging fungal opportunists — in vitro antifungal susceptibilities and review // Clinical Infectious Diseases. — 1997. — 25. — P. 1222—1229.
12. Honraet K., De Vos M.M., Summerbell R.C. et al. Recurrent colonization of successively implanted tracheoesophageal vocal prostheses by a member of the *Fusarium solani* species complex // J. Clinical Microbiol. — 2005. — 43. — P. 770—777.
13. Joost R.E. *Acremonium* in fescue and ryegrass: boon or bane? A Review // J. Anim. Sci. — 1995. — 73. — P. 881—888.

14. Kamuro Y., Takatsuto S., Watanabe T. et al. Practical aspects of brassinosteroid compound [TS303] // Proc. Plant Growth Regul. Soc. Amer. — 1997. — **24**. — P. 111–116.
15. Khrpach V., Zhabinskii V., Groot A. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Ann. Bot. — 2000. — **86**. — P. 441–447.
16. Khrpach V.A., Zhabinskii V.N., Malevannaya N.N. Recent advances in brassinosteroids study and application // Proc. Plant Growth Regul. Soc. Amer. — 1997. — **24**. — P. 101–106.
17. Malabadi R.B., Nataraja K. 24-epi-brassinolide induces somatic embryogenesis in *Pinus wallichiana* A. B. Jacks // J. Plant Sci. — 2007. — **2**. — P. 171–178.
18. Mandava N.B. Plant growth-promoting brassinosteroids // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1988. — **39**. — P. 23–52.
19. Mandava N.B., Sasse J.M., Yopp J.H. Brasinolide, a growth-promoting steroidal lactone // Physiol. plant. — 1981. — **53**. — P. 453–461.
20. Pullman G.S., Zhang Y., Phan B.H. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice // Plant Cell Rep. — 2003. — **22**. — P. 96–104.
21. Sasaki H. Brassinolide promotes an adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyls segments // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 2002. — **71**. — P. 111–116.
22. Yoo S-H., Kim B-Y., Weon H-Y. et al. *Burkholderia soli* sp. nov., isolated from soil cultivated with Korean ginseng // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2007. — **7**. — P. 122–125.
23. Zucker M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue // Plant Physiol. — 1965. — **40**. — P. 779–784.

Получено 07.07.2009

ГОРМОНАЛЬНІ СПОЛУКИ, ЩО ПРОДУКУЮТЬСЯ АСОЦІАЦІЄЮ МІКРООРГАНІЗМІВ ІЗ РИЗОСФЕРИ ЖЕНЬШЕНЮ

I.V. Dragovoz, V.K. Yavorska, V.P. Antoniuk, B.O. Kurchii

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Досліджували вміст природних гормональних сполук, що продукуються асоціацією мікроорганізмів, отриманих із ризосфери женьшеню, а також вплив метаболітів культурального середовища цієї асоціації, екстрактів із біомаси мікроорганізмів асоціації на ріст рослин озимої пшениці. Встановлено, що асоціація продукує індолілоцтову, гіберелову, абсцизову кислоти, а також холестерол і 24-епібрасинолід. Показана висока рістстимулювальна активність як культурального середовища, так і екстрактів із біомаси мікроорганізмів.

HORMONAL SUBSTANCES PRODUCED BY MICROORGANISM ASSOCIATION FROM GINSENG ROOTS

I.V. Dragovoz, V.K. Yavorska, V.P. Antoniuk, B.A. Kurchii

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The content of natural hormonal substances produced by microorganism association from Ginseng roots was studied. It is found that this association synthesizes indolyacetic, gibberellic and abscisic acids, and also cholesterol and 24-epibrassinolide. The effect of metabolites from cultural medium of this association and extracts from the biomass of microorganism association on the growth of winter wheat plants was studied. The high growth stimulating activity of cultural medium and extracts from microorganism association was detected. The received data may be used for creation of complex plant growth regulators.

Key words: microorganism association, biotesting, phytohormones, cholesterol, 24-epibrassinolide.