



УДК 576.80

© 2010

І. В. Драговоз, Н. О. Леонова, Л. О. Білявська, В. К. Яворська,
член-кореспондент НАН України Г. О. Іутинська

Продуктування фітогормонів деякими вільноіснуючими та симбіотичними ґрунтовими мікроорганізмами

*Досліджено якісний і кількісний склад фітогормонів стимульовальної дії у вільноіснуючих та симбіотичних ґрунтових мікроорганізмів родів *Azotobacter* та *Bradyrhizobium*. У культуральних середовищах високоефективних штамів симбіотичних бактерій *B. japonicum* УКМ В-6018 та *B. japonicum* УКМ В-6035 виявлено високий рівень ІОК та цитокінінів порівняно з малоєфективним штамом *B. japonicum* 21110. Високий рівень цих фітогормонів знайдено також у культуральному середовищі активного штаму вільноіснуючого діазотрофа *A. chroococcum* УКМ В-6003. Отримані дані свідчать про те, що висока біологічна активність досліджених штамів симбіотичних та вільноіснуючих бактерій корелює з їх високою здатністю до синтезу фітогормонів ауксинового і цитокінового типу, яка, ймовірно, є одним з механізмів адаптації ґрунтових мікроорганізмів до умов оточуючого середовища, що забезпечує формування ефективних взаємозв'язків між бактеріями і рослинами.*

Застосування в рослинництві біологічних препаратів, створених на основі ґрунтових мікроорганізмів, що стимулюють ріст і розвиток рослин, є одним з важливих агрозаходів підвищення продуктивності сільськогосподарських культур, особливо зернобобових та зернових. Відомо, що однією з характерних властивостей ризосферних бактерій є здатність синтезувати широкий спектр біологічно активних речовин, серед яких сполуки фітогормональної і антифунгальної природи, вітаміни, антибіотики тощо [1–5]. Мікроорганізми — продуценти фітогормонів та інших фізіологічно активних сполук, вступають у асоціативні відношення з рослинами, сприяючи при цьому формуванню симбіотичних зв'язків та функціонуванню утвореної мікробно-рослинної системи або викликаючи розвиток патогенезу [6–8]. За даними літератури, вільноіснуючі мікроорганізми роду *Azotobacter*, які складають значну частину ґрунтових діазотрофів, також здатні до синтезу фітогормонів [2–5].

В умовах сучасного землеробства для підвищення симбіотичного потенціалу мікробно-рослинних систем актуальним є створення композиційних препаратів на основі високоефективних штамів ґрунтових мікроорганізмів, які мають широкий спектр біологічної активності. Виникає питання, чи існує різниця в синтезі фітогормонів у симбіотичних і вільноіснуючих мікроорганізмів у зв'язку з їх ефективністю фіксування атмосферного азоту.

Наша мета — дослідити гормонсинтезувальну здатність деяких вільноіснуючих та симбіотичних ризосферних мікроорганізмів в умовах *in vitro* і фізико-хімічними методами оцінити якісний і кількісний склад синтезованих фітогормонів.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктами дослідження були штами ґрунтових діазотрофних мікроорганізмів з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України; бульбочкові бактерії сої, що відрізняються за активністю азотфіксації в умовах симбіозу: високоефективні штами *B. japonicum* УКМ В-6018 і *B. japonicum* УКМ В-6035 селекції ІМВ НАНУ, які формують на коренях сої активний азотфіксувальний апарат; малоефективний штам *B. japonicum* 21110, який формує на коренях сої бульбочки з низькою азотфіксувальною активністю, одержаний з колекції Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології Російської академії сільськогосподарських наук (Санкт-Петербург, Пушкін). Також досліджували активні штами вільноіснуючих діазотрофів селекції ІМВ НАНУ: *A. chroococcum* УКМ В-6003 та *A. chroococcum* УКМ В-6082 [9]. Серед досліджених ризобій сої штами УКМ В-6018 і УКМ В-6035 за ефективністю симбіотичної азотфіксації у вегетаційних та польових дослідженнях перевищували контроль, активно утворювали бульбочки і сприяли підвищенню урожаю зерна сої [10]. Штам *B. japonicum* 21110 за фізіологічними властивостями належить до бульбочкових бактерій, які є малоактивними порівняно зі штамами УКМ В-6018 та УКМ В-6035 [10, 11].

Визначення фітогормонів проводили в біомасі та культуральних середовищах досліджуваних мікроорганізмів. Основні класи фітогормонів з культуральних середовищ виділяли шляхом їх перерозподілу у двох не змішуваних між собою фазах [12]. Подальше концентрування та очищення екстрактів здійснювали методом препаративно-накопичувальної тонкошарової хроматографії. Якісне та кількісне визначення фітогормонів основних класів проводили методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [13].

Результати дослідження та їх обговорення. Отримані результати показали дуже низький рівень або подекуди повну відсутність гормональних сполук ауксинової та цитокінінової природи в біомасі досліджених штамів вільноіснуючих діазотрофів роду *Azotobacter* (табл. 1). Імовірно, це пояснюється тим, що серед представників одного роду мікроорганізмів зустрічаються як високоактивні, так і слабоактивні продуценти, зокрема, індолілоцтової кислоти (ІОК), а також штами, які не синтезують ауксини [2–4].

У біомасі симбіотичних діазотрофів наявність ІОК спостерігали у високоефективного штаму *B. japonicum* УКМ В-6018 і малоефективного *B. japonicum* 21110 (табл. 2). У першо-

Таблиця 1. Вміст ауксинів та цитокінінів у біомасі вільноіснуючих діазотрофів роду *Azotobacter*

Фітогормони	Питоме продукування фітогормонів, нг/г АСБ	
	<i>A. chroococcum</i> УКМ В-6003	<i>A. chroococcum</i> УКМ В-6082
Ауксини		
ІОК	Сл.	< 8,9
ІОК-гідразид	Сл.	< 97,7
Цитокініни		
Зеатин-рибозид	< 31,5	< 331,5
Ізопентеніл-аденозин	< 37,3	< 50,2
Зеатин	Сл.	Сл.
Ізопентеніл-аденін	< 15,0	Сл.

Примітка. Тут і в табл. 2–4 Сл. — слідові кількості фітогормонів.

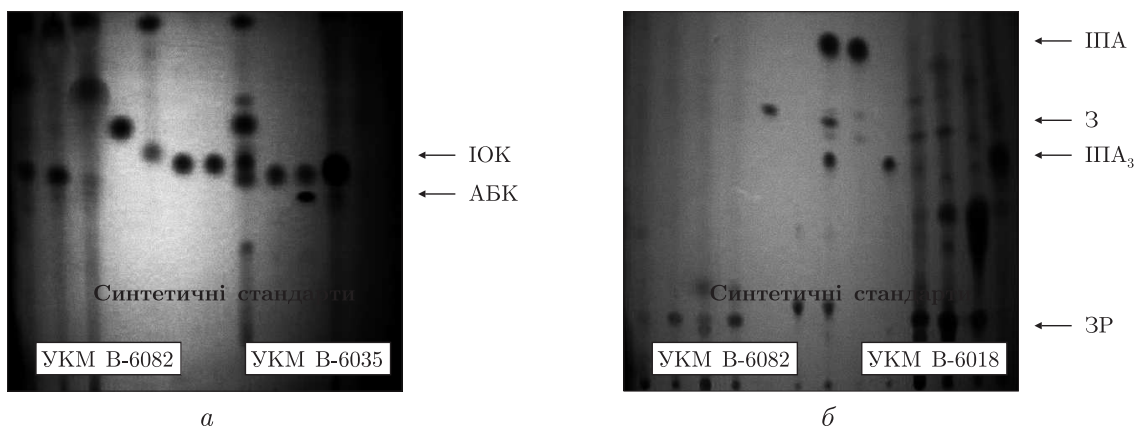


Рис. 1. Хроматографічний розподіл ауксинів і АБК у тонких шарах оксиду кремнію (а) та цитокінінів у тонких шарах оксиду алюмінію (б), виділених з культурального середовища *A. chroococcum* та *B. japonicum*. ІОК — індолілоцтова кислота, АБК — абсцизова кислота, ІПА — ізопентеніл-аденин, ІПА₃ — ізопентеніл-аденозин рибозильований, З — зеатин, ЗР — зеатин-рибозид

го штаму виявлено також незначну кількість індол-3-карбінолу, індол-3-карбоксальдегіду, ІОК-гідразиду та абсцизової кислоти (АБК) (у концентрації 4,7 мкг/г абсолютно сухої біомаси (АСБ)).

Вміст цитокінінів у біомасі досліджуваних ґрунтових мікроорганізмів виявився теж незначним. Але варто відзначити здатність усіх досліджених штамів продукувати зеатин-рибозид — транспортну форму цитокінінів, що, ймовірно, має певну фізіологічну доцільність при взаємодії з рослиною-господарем.

Отже, можна висловити припущення, що досліджені фітогормони не відіграють істотної регуляторної та фізіологічної ролі в бактеріальних клітинах, що підтверджують отримані експериментальні результати: вміст зазначених фітогормонів у бактеріальних клітинах коливається в межах 0,004–2,0 мкг/г АСБ.

Одночасно з визначенням накопичення фітогормонів у біомасі бактерій було досліджено здатність мікроорганізмів продукувати ці сполуки як екзометаболіти в культуральне середовище. На рис. 1 наведено хроматографічний розподіл ауксинів та АБК у тонких шарах оксиду кремнію (а), а також цитокінінів у тонких шарах оксиду алюмінію (б), отриманих з культуральних середовищ *A. chroococcum* УКМ В-6082 і *B. japonicum* УКМ В-6035.

Таблиця 2. Вміст ауксинів, цитокінінів та АБК у біомасі бульбочкових бактерій сої

Фітогормони	Питоме продукування фітогормонів, нг/г АСБ		
	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6018	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	<i>B. japonicum</i> 21110
Ауксини			
ІОК	< 4,5	Сл.	< 2,4
Індол-3-карбоксальдегід	< 1,8	< 1,8	< 2,6
Індол-3-карбінол	< 1,9	< 3,2	Сл.
ІОК-гідразид	< 2,6	Сл.	< 17,4
Цитокініни			
Зеатин	< 63,6	Сл.	Сл.
Зеатин-рибозид	< 208,8	< 76,4	< 70,6
Ізопентеніл-аденин	< 22,1	Сл.	< 19,2
Абсцизова кислота	< 4752,0	Сл.	Сл.

У культуральних середовищах вільноіснуючих діазотрофів роду *Azotobacter* присутні практично всі класи фітогормонів. Штами накопичували досить високі (від 14 до 74 мкг/г АСБ) кількості фітогормонів ауксинової та цитокінінової природи (табл. 3). При цьому серед цитокінінів переважала їх транспортна форма — зеатин-рибозид, яка в подальшому може використовуватися рослиною. Відомо, що рибозилування є одним з методів інактивації цитокінінів у рослин, при цьому їх фізіологічна активність дуже низька або повністю відсутня [14, 15]. Саме в такий спосіб регулюється пул ендогенних фізіологічно активних цитокінінів у рослинних тканинах.

Підкреслимо також, що дуже високою здатністю до синтезу ауксинів і цитокінінів характеризувались симбіотичні штами роду *Bradyrhizobium*, зокрема ризобії сої (табл. 4). Високоєфективний мікросимбіонт сої *B. japonicum* УКМ В-6035 накопичував у культуральному середовищі більше 770 мкг/г АСБ ІОК і близько 670 мкг/г АСБ цитокінінів, переважно зеатин-рибозиду.

Деяко іншим був спектр фітогормонів, що продукував штам *B. japonicum* УКМ В-6018. У культуральному середовищі цього штаму переважали цитокініни різних форм, загальний вміст яких становив більш як 1550 мкг/г АСБ. На противагу ефективним ризобіям сої малоефективний штам *B. japonicum* 21110 продукував істотно менше гормонів: зеатин-рибозиду — у 5,0–6,3 раза, зеатину — у 2,7–15,7 раза, ІОК — у 2,3–200 разів.

Таблиця 3. Питоме продукування ауксинів, цитокінінів та АБК у культуральне середовище вільноіснуючими діазотрофами роду *Azotobacter*

Фітогормони	Питоме продукування фітогормонів, мкг/г АСБ	
	<i>A. chroococcum</i> УКМ В-6003	<i>A. chroococcum</i> УКМ В-6082
Ауксини		
ІОК	< 13,98	> 29,32
Індол-3-карбоксамальдегід	Сл.	< 2,33
Цитокініни		
Зеатин-рибозид	< 73,97	< 28,59
Ізопентеніл-аденозин рибозильований	Сл.	< 0,55
Зеатин	< 18,28	Сл.
Ізопентеніл-аденін	< 1,42	Сл.
Абсцизова кислота	< 10,88	< 7,74

Таблиця 4. Питоме продукування ауксинів, цитокінінів та АБК у культуральне середовище бульбочковими бактеріями роду *Bradyrhizobium*

Фітогормони	Питоме продукування фітогормонів, мкг/г АСБ		
	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6018	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	<i>B. japonicum</i> 21110
Ауксини			
ІОК	< 8,88	> 772,76	< 3,84
Індол-3-карбоксілова кислота	< 4,60	Сл.	Сл.
Цитокініни			
Зеатин-рибозид	< 855,01	> 672,55	< 135,91
Ізопентеніл-аденозин рибозильований	< 352,44	Сл.	< 8,03
Зеатин	< 345,00	< 60,29	< 22,02
Ізопентеніл-аденін	< 1,71	< 4,94	Сл.
Абсцизова кислота	< 3,65	< 71,88	< 2,33

Відомо, що високоефективні штами комплементарних мікроорганізмів характеризуються підвищеною здатністю до синтезу певних класів гормонів стимулювальної дії [5]. Ця властивість ризобій, імовірно, відіграє важливу роль у процесах пізнання, інфікування рослини і формування ефективного симбіозу. Отримані результати свідчать про пряму залежність між гормонсинтезувальною здатністю і ефективністю певних штамів мікроорганізмів, зокрема роду *Bradyrhizobium* [2].

Зауважимо, що практично всі (за винятком *B. japonicum* УКМ В-6035) досліджувані мікроорганізми були здатні продукувати гібереліни в культуральне середовище. Але порівняно з ауксинами і цитокінінами вони були присутні в незначній кількості (не більше 7–19 мкг/л). Відомо, що екзогенні гібереліни здатні стимулювати ріст і розвиток бактерій родів *Azotobacter*, *Pseudomonas*, дріжджів і міцеліальних ризосферних грибів, а також азотфіксацію в деяких ціанобактерій [3, 4]. Проте їх невисокий рівень у культуральних середовищах різних штамів *Azotobacter* та *Bradyrhizobium* в наших дослідках, імовірно, свідчить про незначну роль у симбіотичних взаємозв'язках між мікроорганізмами та рослиною.

Таким чином, висока біологічна активність досліджуваних штамів вільноіснуючих і симбіотичних азотфіксувальних бактерій, на нашу думку, значною мірою пов'язана з їх підвищеною здатністю до синтезу і продукування гормонів ауксинового та цитокінінового типу, яку можна розглядати як один з механізмів адаптації ґрунтових мікроорганізмів до умов оточуючого середовища. Зазначимо також, що фітогормональні сполуки відіграють важливу роль у процесах обміну продуктами метаболізму між рослиною і бактеріями, що позитивно впливає на ростові і формотворчі процеси у рослини, з одного боку (за рахунок зміни пулу і співвідношення ауксинів і цитокінінів у рослинних тканинах), і колонізацію ризоплани ґрунтовою мікрофлорою, з іншого.

Культуральні рідини досліджуваних штамів ґрунтових мікроорганізмів (родів *Bradyrhizobium* та *Azotobacter*) можна використовувати для створення комбінованих препаратів, що поєднують здатність культур до фіксування азоту і одночасно мають властивості стимуляторів росту рослин. На думку авторів, такий підхід є виправданим кроком при створенні нових ефективних композиційних препаратів для екологічного землеробства.

1. Мишке И. В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. – Рига: Зинатне, 1988. – 151 с.
2. *Phytohormones in soils: microbial production and function* / Ed. W. T. Frankenberger, Jr. M. Arshad. – New York: Dekker, 1995. – 503 p.
3. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – 42, № 2. – С. 133–143.
4. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов // Там же. – 2006. – 42, № 3. – С. 261–268.
5. Моргул В. В., Коць С. Я., Кириченко Е. В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – 41, № 3. – С. 187–206.
6. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. – 2nd ed. // Ed. R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. – 472 p.
7. Hirsch A. M., Fang Y., Asad S., Kapulnik Y. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses // *Plants Soil*. – 1997. – 194, No 1–2. – P. 171–184.
8. Захарычев В. В. Фитогормоны, их аналоги и антагонисты в качестве гербицидов и регуляторов роста растений. – Москва: Изд-во РХТУ им. Д. И. Менделеева, 1999. – 56 с.
9. Скочинская Н. Н., Антипчук А. Ф. К вопросу о колонизирующей способности бактерий рода *Azotobacter* // Микробиол. журн. – 1993. – 55, № 3. – С. 44–47.

10. Титова Л. В., Леонова Н. О., Верхотурова И. С., Антипчук А. Ф., Мандровская Н. М., Маменко П. М., Иутинская Г. А. Использование микробных ассоциаций как основы композиционных биопрепаратов для повышения продуктивности сои // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку: У 2 т. / Голов. ред. В. В. Моргун. – Київ: Логос, 2009. – Т. 1. – С. 437–445.
11. Леонова Н. О. Физиологічна активність *Bradyrhizobium japonicum* та ефективність соєво-ризобіального симбіозу за дії фіторегулювальних речовин: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2006. – 23 с.
12. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. – 78 с.
13. Савинский С. В., Кофман И. Ш., Кофанов В. И., Стасевская И. Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. – 1987. – 19, № 2. – С. 210–215.
14. Дерфлинг К. Гормоны растений. Системный подход / Пер. с нем. Н. С. Гельман под ред. В. И. Кефели. – Москва: Мир, 1985. – 304 с.
15. Кулаева О. Н., Кузнецов В. В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиология растений. – 2002. – 49, № 4. – С. 626–640.

Институт фізіології рослин і генетики

НАН України, Київ

Институт мікробіології і вірусології

ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 08.04.2010

I. V. Dragovoz, N. O. Leonova, L. O. Biliavska, V. K. Yavorska,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **G. O. Iutynska**

Phytohormone production by some free-living and symbiotic soil microorganisms

*The qualitative and quantitative compositions of phytohormones with stimulating action of free-living and symbiotic soil microorganisms Azotobacter and Bradyrhizobium have been researched. In a cultural medium of highly efficient strains of symbiotic bacteria *B. japonicum* UKM B-6018 and *B. japonicum* UKM B-6035, the levels of indolylacetic acid and cytokinines are higher than those of the inefficient strain *B. japonicum* 21110. The high enough level of these phytohormones was also found in a culture medium of an active strain of free-living bacteria *A. chroococcum* UKM B-6003. The obtained data show that the high biological activity of the researched strains of symbiotic and free-living bacteria correlates with their high capacity for the synthesis of phytohormones of the auxine and cytokinine types. It is one of the mechanisms of soil microorganisms' adaptation to environmental conditions which provides the formation of effective relationships between bacteria and plants.*