БІОСИНТЕЗ ФІТОГОРМОНІВ ШТАМАМИ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* З РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ

О.М. Юр'єва, І.В. Драговоз, Н.О. Леонова,
Л.О. Білявська, С.О. Сирчін, І.М. Курченко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: elenayurieva@ukr.net

Мета. Дослідження здатності до синтезу позаклітинних ауксинів, цитокінінів і абсцизової кислоти (АБК) ендоефітним і сапротрофним штамами *Penicillium funiculosum*. **Методи.** Специфічне біотестування на ауксинову і цитокінінову активності. Кількісна спектроденситометрична тонкошарова хроматографія. **Результати.** Встановлено, що екстракти культуральних фільтратів (КФ) *P. funiculosum* проявляли ауксинову і цитокінінову активності. За дослідження якісного і кількісного складу трьох класів фітогормонів показано, що ендоефітний штам синтезує вищі рівні фізіологічно активних форм ауксинів (індол-3-оцтової кислоти) – на 55%, цитокінінів (зеатину) – на 97% і на 76% – абсцизової кислоти порівняно з сапротрофом цього виду. **Висновки.** Досліджені штами *P. funiculosum* з різних екотонів синтезують ауксини, цитокініни і АБК. Рівні і співвідношення синтезованих гормонів-стимуляторів і АБК свідчать про формування дослідженими штамами *P. funiculosum* різних типів взаємовідношень з рослинами – мутуалістичних та/або асоціативних.

Ключові слова: *Penicillium funiculosum*, фітогормони, ауксини, цитокініни, абсцизова кислота, ендоефіт, сапротроф.

Останнім часом ендоефітні гриби викликають значний інтерес як перспективне джерело вторинних метаболітів з широким спектром біологічної активності, зокрема, регуляторів росту рослин [11, 12, 22, 32–34]. Біотичні й абіотичні стреси вимагають від рослини пластичності їх метаболізму, а саме – адаптації регуляторних систем до дії стресових чинників. До основних класів фітогормонів, що регулюють фізіологічні процеси росту і розвитку рослин, належать ауксини, гібереліни (ГК), цитокініни – із стимулювальною дією, абсцизова кислота (АБК), етилен – інгібіторною. Взаємодія (“cross-talk”) ауксинів і цитокінінів з іншими гормонами викликає особливий інтерес, оскільки вони відіграють важливу роль у регуляції процесів, пов’язаних з реалізацією різних онтогенетичних програм.

Сапротрофні та ендоефітні мікроскопічні гриби синтезують фітогормональні сполуки, які у сучасній літературі називають “plant-like hormones”. Вони стимулюють проростання конідій гриба-продуцента, швидкість росту міцелію і його галуження [6, 22]. Ендоефіти утворюють індол-3-оцтову кислоту (ІОК), цитокініни та інші стимулятори росту, що допомагають рослині-хазяїну виживати за умов дії стресових факторів [11, 12, 22, 32–34]. Грунтові мікроміцети у процесі формування асоціативних взаємовідношень з рослинами також продукують фітогормони, що сти-

мулюють ріст і розвиток рослин, внаслідок чого збільшується площа поверхні кореневої системи рослин [4, 10]. Проте механізми симбіотичних та асоціативних взаємовідносин мікроорганізмів з рослинами залишаються недостатньо вивченими.

Мікроскопічні гриби роду *Penicillium* широко розповсюджені у різних ґрунтах і ризосфері рослин, також вони є ендofітами багатьох рослин [10–12, 22, 32–34]. Види цього роду, і *P. funiculosum* зокрема, продукують спектр біологічно активних метаболітів, у тому числі ауксини і гібереліни, що позитивно впливає на ріст і розвиток рослини-хазяїна, особливо за дії абіотичних і біотичних стресових чинників [11]. У наших попередніх дослідженнях показано, що штами *P. funiculosum* синтезують гібереліни ГК₃, ГК₄ і ГК₇ незалежно від трофічної групи [35]. Вивчення здатності мікроміцетів з різних екоотопів синтезувати інші фітогормони, зокрема, ауксини, цитокініни і АБК, є важливим для розуміння симбіотичних та асоціативних взаємовідношень з рослинами.

Метою нашої роботи було дослідження здатності до синтезу позаклітинних ауксинів, цитокінінів та абсцизової кислоти ендofітним і сапротрофним штамами *Penicillium funiculosum*.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були ендofітний штам *P. funiculosum* 16795, виділений з листа журавлини (Житомирська обл.), і сапротрофний штам 16790, виділений з чорнозему (Дніпропетровська обл.). Штами підтримуються у колекції культур мікроскопічних грибів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Культивування мікроміцетів проводили в колбах Ерленмейєра об'ємом 750 мл у глибинних умовах (210÷230 об/хв) за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ впродовж 6 діб [3] 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% [34].

Середовище засівали інокулюмом – 48-годинною культурою мікроміцета, вирощеного у картопляно-глюкозному середовищі [3] 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). Міцелій гриба висушували за температури 70°C до постійної маси [3]. З культуральних фільтратів (КФ) кожного штаму отримували відповідні екстракти, які у подальшому використовували для проведення фітотестів на ауксинову і цитокінінову активності, а також для якісного і кількісного визначення основних класів фітогормонів. Екстракт для визначення ауксинової активності отримували з КФ відповідного штаму за рН 3,0 та екстрагували етилацетатом. Для визначення цитокінінової активності КФ (рН 8,0) екстрагували н-бутанолом. Фракції випарювали досуха і перерозчиняли у 80% етанолі [13].

Для визначення ауксинової активності насіння озимої пшениці сорту Альбатрос одеський стерилізували 10% розчином H_2O_2 і замочували у водогінній воді кімнатної температури на 2–3 год. Потім розкладали у кювети між аркушами зволоженого фільтрувального паперу, кювети ставили у термостат для пророщування за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ і витримували впродовж 72 год [5]. Оптимальною для біотесту є початкова довжина

колеоптилів 2,5 см. Колеоптилі поміщали у чашки Петрі з дистильованою водою, потім з них вирізали 4–5-міліметрові циліндри, відступаючи від верхівки 3 мм. Потім відрізки переносили у колби з дистильованою водою, які ставили в апарат для струшування у темряві на 2–3 год. Досліджували розведення екстрактів КФ від 1:100 до 1:500. Чашки Петрі з відрізками колеоптилів (по 10 шт.) та аліквотами (по 3 мл) водних розчинів відповідних розведень екстрактів КФ штамів мікроміцетів витримували у термостаті за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ впродовж 24 год. Як контролю використовували препарат-еталон індол-3-оцтової кислоти (ІОК, 10^{-5} М) і відстояну водогінну воду. Про ауксинову активність судили за видовженням відрізків колеоптилів озимої пшениці щодо контролю.

Цитокінінову активність визначали з використанням етиольованих сім'ядольних листків огірка сорту Ніжинський [13]. Насіння огірків замочували у воді на 2 год, розкладали у кювети на попередньо зволожений фільтрувальний папір і пророщували у темряві за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Етиольовані сім'ядольні листки зважували за слабого освітлення через 6 діб. Сім'ядолі розкладали по 10 шт. у чашки Петрі з аліквотами (по 3 мл) водних розчинів розведення екстрактів КФ досліджених штамів від 1:100 до 1:1000. Біотест проводили у термостаті за тієї ж температури впродовж доби. Сім'ядольні листки ретельно висушували і зважували. Зміну маси сім'ядольних листків виражали у % щодо контролю. Контролями були препарат-еталон бензиламінопурин (БАП) у концентрації 10^{-5} М і відстояна водогінна вода.

Попереднє очищення і концентрування екстрактів КФ проводили методом препаративно-накопичувальної тонкошарової хроматографії на пластинках із силікагелем марки Silufol UV₂₅₄ (Chemapol, Чехія) у суміші розчинників, застосованих послідовно: хлороформ, 12,5% водний аміак, етилацетат : оцтова кислота (20:1). Очищені таким чином екстракти ауксинів і АБК розділяли на пластинках з оксидом кремнію у системі хлороформ:етилацетат:оцтова кислота (100:100:1), а екстракти цитокінінів – з оксидом алюмінію у системі хлороформ:оцтова кислота (19:1) (Merck, Німеччина) [26]. Кількісне визначення фітогормонів проводили з використанням скануючого спектроденситометра «Сорбфіл» (РФ). Як стандарти використовували синтетичні фітогормони фірм Sigma-Aldrich (Німеччина) і Acros Organics (Бельгія). Кількість продукованих позаклітинних гормонів виражали у мкг на мл культурального фільтрату [11, 12, 32–34].

Статистичну обробку отриманих експериментальних даних виконували з використанням Microsoft Excel.

Результати. Як свідчать отримані дані, обидва штами *P. funiculosum* 16795 і 16790, виділені із різних еконіш, проявляли ауксинову активність (рис. 1). За розведення екстракту КФ ендofіта *P. funiculosum* 1:100 практично не спостерігали приріст довжини колеоптилів (до 2%). За подальших розведень екстракту КФ 1:200÷1:500 ця величина становила до 15% щодо контролю. Сапротрофний штам у всіх варіантах розведень також проявляв ауксинову активність, приріст довжини колеоптилів коливався у межах 12–16% залежно від розведення екстракту КФ. Встановлено, що приріст довжини колеоптилів за дії екстрактів КФ (1:200÷1:500) ендofіт-

ного і сапротрофного штамів *P. funiculosus* достовірно не відрізнявся, тоді як препарат-еталон (ІОК, 10^{-5} М) стимулював приріст колеоптилів огірка на 25% порівняно з контролем.

Рис. 1. Ауксинова активність екстрактів КФ ендофітного і сапротрофного штамів *P. funiculosus* (біотест – колеоптили пшениці озимої сорту Альбатрос одеський)

Ендофітний і сапротрофний штами *P. funiculosus* 16795 і 16790 також характеризувались цитокініноювою активністю (рис. 2). За низьких розведень екстрактів КФ (1:100÷1:500) обидва штами пригнічували приріст маси етиологованих сім'ядольних листків, що свідчить про значну кількість метаболітів, які інгібують приріст маси сім'ядоль огірка. За подальших розведень екстракту КФ (1:900 і 1:1000) встановлено значну відмінність між ендофітним і сапротрофним штамами *P. funiculosus*. Так, для ендофіта у вказаних розведеннях приріст маси сім'ядоль досягав 27% і 50% відповідно, у той час як для сапротрофа становив лише 6% і 9% відповідно. Виходячи з отриманих результатів, ендофітний штам *P. funiculosus* 16795 проявляв значно вищу (4,5–5,5 разів) цитокінінову активність порівняно з сапротрофом, імовірно, за рахунок різного спектру екзометаболітів бутанольних екстрактів КФ.

У подальшому проведено визначення трьох класів фітогормонів (ауксинів, цитокінінів і абсцизової кислоти) штамів *P. funiculosus* з різних еконіш методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії, як описано вище. Показано, що штам-ендофіт синтезує на 55% більшу кількість фізіологічно активної індол-3-оцтової кислоти (ІОК) порівняно з сапротрофом (таблиця). Також цей штам утворює індолні сполуки: ІОК-гідразид, індол-3-бутират та індол-3-карбоксальдегід $1,46 \pm 0,07$; $0,62 \pm 0,04$ і $0,16 \pm 0,01$ мкг/мл відповідно. Сапротрофний штам синтезує на 26% більшу кількість ІОК-гідразиду і на 41% – індол-3-карбоксальдегіду. У ендофітного штаму не знайдено індол-3-карбінол, що утворюється внаслідок деградації ІОК, у той час як у сапротрофа виявляли незначну його кількість – $0,04 \pm 0,01$ мкг/мл. За сумарним рівнем синтезу ауксинів не було виявлено достовірної різниці між штамами *P. funiculosus* з різних еконіш.

Рис. 2. Цитокінінова активність екстрактів КФ ендоситного і сапротрофного штамів *P. funiculosum* (біотест – етіольовані сім'ядольні листки огірка сорту Ніжинський)

Встановлено, що досліджені штами *P. funiculosum* утворюють як фізіологічно активні, так і транспортні форми цитокінінів (таблиця). Ендосит продукував удвічі більшу кількість зеатину, втричі – ізопентиніладеніну і у 2,4 рази – ізопентиніладенозину, ніж сапротроф. Проте сапротрофний штам характеризувався на 20% вищим рівнем синтезу транспортної форми цитокінінів, а саме зеатинрибозиду. Слід також зазначити, що загальна кількість цитокінінів, синтезованих штамом-ендоситом, була у 2,2 рази більшою, ніж у сапротрофа.

Таблиця
Фітогормони ендоситного і сапротрофного штамів *Penicillium funiculosum*

Фітогормон	Вміст фітогормону, мкг/мл	
	Ендосит 16795	Сапротроф 19790
Ауксини		
Індол-3-оцтова кислота	4,00 ± 0,24	2,58 ± 0,18
Індол-3-оцтової кислоти гідрозид	1,46 ± 0,07	3,30 ± 0,22
Індол-3-бутират	0,62 ± 0,04	0,47 ± 0,24
Індол-3-карбінол	0	0,04 ± 0,01
Індол-3-карбоксалдегід	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Загальна кількість ауксинів	6,24 ± 0,49	6,61 ± 0,52
Цитокініни		
Зеатин	3,55 ± 0,22	1,80 ± 0,12
Зеатинрибозид	3,02 ± 0,21	3,60 ± 0,17
Ізопентиніладенін	21,70 ± 1,73	7,35 ± 0,58
Ізопентиніладенозін	1,94 ± 0,12	0,81 ± 0,05
Загальна кількість цитокінінів	30,21 ± 2,42	13,56 ± 1,07
Абсцисова кислота		
Абсцисова кислота	3,97 ± 0,25	2,25 ± 0,15

Встановлено, що штами *P. funiculosus* синтезують також фітогормон антистресової та інгібувальної дії – АБК. Показано, що штам-ендофіт характеризується на 76% вищим рівнем синтезу цього фітогормону порівняно з сапротрофом.

Таким чином, отримані у результаті фітотестів дані свідчать про наявність серед екзометаболітів досліджених штамів *P. funiculosus* з різних еконіш фітогормонів-стимуляторів ауксинової і цитокінінової природи. У процесі біотестування не отримано відмінностей між ендоефітним і сапротрофним штамом *P. funiculosus* за рівнем ауксинової активності, у той час як цитокінінова активність ендоефіта була вищою у 4,5 і 5,5 разів у розведеннях 1:900 і 1:1000 екстрактів КФ, ніж сапротрофа.

За дослідження якісного і кількісного складу трьох класів фітогормонів встановлено, що ендоефітний штам *P. funiculosus* синтезує на 55% вищі рівні фізіологічно активних форм ауксинів (індол-3-оцтової кислоти), у два рази – цитокінінів (зеатину) і на 76% – абсцизової кислоти порівняно з сапротрофом.

Обговорення. Мікроскопічні гриби здатні продукувати широкий спектр біологічно активних речовин, у тому числі фітогормони [4, 6, 10–12, 22, 29, 30–35]. Останнім часом з'являється все більше відомостей, що підтверджують важливість рослинних гормонів (ауксинів, гіберелінів, цитокінінів, абсцизової кислоти, етилену) у прямій чи опосередкованій регуляції метаболізму рослин в умовах абіотичних стресів. У процесі формування симбіозу з рослиною-хазяїном ендоефіти синтезують фітогормональні сполуки, що відіграють важливу роль сигналіngu [16, 22, 28, 29]. Сапротрофні мікроміцети також утворюють фітогормони, що є важливою складовою встановлення ними асоціативних взаємовідносин з рослинами. Так, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium corylophilum*, *P. cyclopium*, *P. funiculosus* і *Rhizopus stolonifer*, виділені з ризосфери і ризоплани рослин, продукують фітогормональні сполуки із фітостимулювальною активністю [10].

Одним з класів фітогормонів-стимуляторів є ауксини, що впливають на видовження і поділ клітин, забезпечують апікальне домінування, проростання насіння, необхідні для формування і розвитку зародків, коріння і пагонів рослин [2, 31], регулюють процеси граві- і фототропізму рослин [17]. На сьогодні відомо, що біосинтез ауксинів мікроміцетами може відбуватися як триптофан-залежним, так і триптофан-незалежним шляхами [12, 24, 25]. Види *Fusarium graminearum* і *Colletotrichum gloeosporioides* синтезують ауксини з одного попередника – індол-3-ацетаміду; у цих грибів ідентифіковано такі ж гени синтезу ауксинів, як і у бактерій [25, 30]. Фітопатогенні види родів *Ustilago* і *Rhizoctonia* утворюють ІОК з іншого попередника – індол-3-пірувату [8, 24]. Крім того, для деяких мікроскопічних грибів відомий триптофан-незалежний шлях біосинтезу ауксинів. Так, 17 грибів-ендофітів, виділених з *Boswellia sacra*, синтезували ІОК триптофан-залежним шляхом, проте лише один штам *Aureobasidium* sp. BSS6 характеризувався L-триптофан незалежним шляхом біосинтезу [12].

Для мікроскопічних грибів роду *Penicillium*, у тому числі *P. funiculosus*, показано біосинтез ауксинів триптофан-залежним шляхом [33]. За молекулярно-генетичними ознаками досліджені нами ендоефітний і сапротроф-

ний штами належать до одного виду *Talaromyces funiculosus* (анаморфа *Penicillium funiculosum*) [35]. Виходячи з цього, синтез ауксинів штамами *P. funiculosum* з різних еконіш відбувається також триптофан-залежним шляхом.

Показано, що ІОК, яку синтезують ендоефіти, є важливим фактором встановлення симбіотичних взаємовідношень ендоефіта і рослини-хазяїна [12]. Відомо, що ендоефіти *Chrysosporium pseudomerdarium*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Phoma glomerata* і *Paecilomyces formosus*, ізолювані з коренів *Glycine max* і *Cucumis sativus*, синтезують 0,23 ÷ 71,51 мкг/мл ІОК [34]. Ендоефітний штам *Phoma glomerata* продукує 3,89 мкг/мл ІОК, *Penicillium* sp. – 29,8 мкг/мл [33]. Штам-ендоефіт *Aureobasidium* sp. BSS6 утворює 3,11±0,29 нмоль/мл ІОК [12]. Так, ендоефіти *Talaromyces cellulolyticus* і *Penicillium griseofulvum*, виділені з *Crocus sativus*, утворюють ІОК у концентрації 60,3 і 66,15 мг/л відповідно [32]. GC/МС SIM аналіз культурального фільтрату штаму-ендоефіта *P. funiculosum* показав наявність 14,85 мкг/мл ІОК [11]. У наших дослідженнях показано, що ендоефітний штам *P. funiculosum* 16795 синтезує на 55% більше ІОК, ніж сапротрофний (4,00 ± 0,24 мкг/мл), що узгоджується з даними інших авторів.

Синтез фітогормональних речовин є характерним також і для ґрунтових мікроміцетів. Так, штами *Cladosporium cladosporioides* утворюють ауксини, цитокініни, гібереліни та абсцизову кислоту [4]. Загальний рівень синтезу ауксинів *C. cladosporioides* 495 був у 1,25 рази вищим порівняно з дослідженим нами сапротрофом *P. funiculosum* і не відрізнявся від такого ендоефіта. У той же час вивчені нами штами *P. funiculosum* синтезували значно вищі кількості цитокінінів та АБК.

Відомо, що синтез гормонів-стимуляторів і інгібіторів фітопатогенними і мікоризними грибами є фактором вірулентності [6]. У більшості випадків рослини, що взаємодіють з мікоризними грибами, характеризуються підвищеним вмістом ауксинів [18]. Так, мутанти ектомікоризних видів *Hebeloma cylindrosporum* з підвищеним синтезом ауксинів здатні проникати у тканини коренів *Pinus pinaster*, однак не виявлено відмінностей між ростом рослин, які колонізовані мутантними і природними штамами грибів [15]. Даний факт може свідчити про те, що синтез грибами ауксинів і целюлозолітичних ферментів сприяє їх проникненню у рослини, проте не є визначальним фактором вірулентності. Отримані нами дані щодо вищого на 55% рівня синтезу ІОК ендоефітним штамом *P. funiculosum* обумовлюють важливу роль ІОК у процесах саме проникнення ендоефітного гриба у рослину (таблиця).

Гриби-симбіонти утворюють ауксини не лише для регуляції процесів росту і розвитку рослин, але й використовують їх для потреб власного метаболізму. Дія ауксинів на фізіологічні процеси грибів може значно відрізнятися залежно від виду гриба і концентрації фітогормону. Так, екзогенна ІОК сприяє проростанню спор аскоміцета *Neurospora crassa* [21] і у той же час пригнічує проростання конідій патогена *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* [27]. Як і у рослинах, ефект ауксинів на фізіологічні процеси у грибах залежить від їх концентрації: низькі концентрації екзогенного ауксину сприяють росту мікроміцета, у той час як високі – пригнічують

[14]. Отримані нами дані щодо вищого синтезу фізіологічно активної ІОК ендоефітним штамом, імовірно, пов'язані також з його здатністю до швидкого проникнення у тканини рослини-хазяїна.

Серед відомих на сьогодні класів фітогормонів важливе місце у встановленні симбіотичних взаємозв'язків між рослинами і мікроорганізмами посідають цитокініни, що регулюють фізіологічні процеси рослин – індукують поділ і диференціацію клітин рослин у процесі утворення коренів і пагонів, їх галуження, стимулюють проростання насіння, пригнічення старіння листя, регулюють роботу продихів [6].

Слід зазначити, що рівень цитокінінів змінюється за різних типів взаємодії рослин і патогенних мікроорганізмів [6]. Зокрема, більшість некотрофних паразитів, на відміну від (гемі-) біотрофних грибів, не синтезують цитокініни. На підставі цього автори зробили припущення, що утворення цитокінінів залежить від способу існування мікроорганізму.

Показано, що накопичення цитокінінів у тканинах, заражених *Ustilago maydis*, корелює з вірулентністю цього патогена, але доказу того, що вони є фактором вірулентності на генетичному рівні встановлено не було [19]. На нашу думку, продукування штамом-ендофітом *P. funiculosum* більшої загальної кількості цитокінінів залежить від еконіші і може сприяти посиленню метаболічних процесів у рослині, особливо за рахунок синтезу фізіологічно активних форм [6].

Цитокініни відіграють значну роль у фізіологічних процесах грибів, особливо розвитку гіф і поглинанні ними поживних речовин [7, 20]. Так, цитокініни сприяють галуженню міцелію ектомікоризних грибів, впливають на проникність мембрани гіф, а отже й на іонний і водний транспорт [1]. Так, за дії деяких цитокінінів змінюється вміст K^+ , Ca^{2+} , P^{3+} і Na^+ у міцелії базидіоміцета *Suillus variegatus* [23]. Вплив цитокінінів на розвиток гіф грибів залежить від їх концентрації і структури [9]. Отже, вища загальна кількість цитокінінів дослідженого нами ендоефіта *P. funiculosum*, порівняно з ґрунтовим, може сприяти як розвитку грибного симбіонта у рослині-хазяїні, так і підсиленню метаболізму самої рослини.

Стійкість рослин до впливу несприятливих факторів середовища пов'язана із захисними реакціями, що формуються за участі гормонів. АБК – антистресовий фітогормон з інгібіторною дією, викликає закриття продихів за умов водного стресу, пригнічує ріст пагонів, індукує синтез запасних білків у насінні, а також запобігає його передчасному проростанню [16, 29]. У науковій літературі мало відомостей щодо впливу АБК на фізіологічні процеси грибів, а також ролі цього гормону у формуванні симбіотичних взаємовідносин з рослинами. Так, АБК незначною мірою підвищує швидкість росту фітопатогенного гриба *Ceratocystis fimbriata*, сприяє проростанню і формуванню апресорій у *Magnaporthe oryzae* і його інвазії [28]. У той же час фітопатогенні мікроміцети продукують АБК, що також може виступати фактором вірулентності [28, 29]. Досліджений ендоефіт *P. funiculosum* синтезує у 1,8 рази більшу кількість АБК, ніж сапротроф. Відомо, що АБК, за даними Стес із співавторами, відіграє важливу роль у встановленні симбіотичних відносин грибів з рослиною-хазяїном, що може обумовлювати вищий рівень синтезу АБК штамом-ендофітом [29].

Таким чином, нами показано, що досліджені штами *P. funiculosum* з різних еконіш синтезують ауксини, цитокиніни і АБК. Продуктування штамми *P. funiculosum* як гормонів-стимуляторів, так і АБК може свідчити про те, що вони виступають у ролі регуляторів фізіологічних процесів рослин. Вищі рівні синтезу ІОК, цитокинінів і АБК ендofітним штамом *P. funiculosum* можуть впливати на різні етапи встановлення ним мутуалістичних відносин з рослиною – від процесу проникнення у рослину-хазяїна до його розвитку всередині рослинних тканин. Також можна припустити, що ендofіти позитивно впливають на метаболізм рослин і за рахунок синтезу фітогормонів посилюють ефективність формування симбіотичних взаємовідношень у системі «рослина–ендofіт».

За дії фітогормональних сполук, що продукує сапротрофний штам *P. funiculosum*, може підвищуватися не лише ріст і розвиток коренів рослини, але й доступність для них елементів мінерального живлення, зокрема, фосфорного [22, 29].

Дослідження ролі асоційованої мікробіоти та ендofітів у взаємодії з рослинами за рахунок синтезу гормональних метаболітів дозволить у подальшому позитивно впливати на фізіологічні процеси у рослин, пом'якшувати або нівелювати вплив стресових факторів, а також стабілізувати продуктивність рослин.

БИОСИНТЕЗ ФИТОГОРМОНОВ ШТАММАМИ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* ИЗ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ

*Е.М. Юрьева, И.В. Драгозов, Н.О. Леонова,
Л.А. Белявская, С.А. Сырчин, И.Н. Курченко*

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

Резюме

Цель. Исследование способности к синтезу внеклеточных ауксинов, цитокининов и абсцизовой кислоты (АБК) эндofитным и сапротрофным штаммами *Penicillium funiculosum*. **Методы.** Специфическое биотестирование на ауксиновую и цитокининовую активности. Количественная спектроденситометрическая тонкослойная хроматография. **Результаты.** Установлено, что экстракты культуральных фильтратов (КФ) *P. funiculosum* проявляли ауксиновую и цитокининовую активности. При исследовании качественного и количественного состава трех классов фитогормонов показано, что эндofитный штамм синтезирует высокие уровни физиологически активных форм ауксинов (индол-3-уксусной кислоты) – на 55%, цитокининов (зеатина) – на 97% и на 76% – абсцизовой кислоты по сравнению с сапротрофом этого вида. **Выводы.** Исследованные штаммы *P. funiculosum* из разных экотопов синтезируют ауксин, цитокинины и АБК. Уровни и соотношения синтезированных гормонов-стимуляторов и АБК свидетельствуют о формировании исследованными штаммами *P. funiculosum* разных типов взаимоотношений с растениями – мутуалистических и/или ассоциативных.

Ключевые слова: *Penicillium funiculosum*, фитогормоны, ауксин, цитокинины, абсцизовая кислота, эндofит, сапротроф.

BIOSYNTHESIS OF PHYTOHORMONES BY *PENICILLIUM FUNICULOSUM* STRAINS FROM DIFFERENT ECOLOGICAL NICHES

**O.M. Yurieva, I.V. Dragovoz, N.O. Leonova,
L.O. Biliavska, S.O. Syrchin, I.M. Kurchenko**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Aim. Study of the ability to synthesize extracellular auxins, cytokinins and abscisic acid (ABA) by endophytic and saprotrophic *Penicillium funiculosum* strains. **Methods.** Specific biotesting for auxin and cytokinin activities. Quantitative spectrodensitometric thin-layer chromatography. **Results.** It was shown that the fungal culture filtrates (CF) of *P. funiculosum* established auxin and cytokinin activities. As a result of study of qualitative and quantitative content of the three classes of phytohormones, was demonstrated that the endophytic strain synthesized high level of physiologically active form of auxins (indole-3-acetic acid) by 55%, cytokinins (zeatin) by 97% and 76% by abscisic acid than saprotrophic one. **Conclusions.** The studied *P. funiculosum* strains from different ecotopes synthesized auxins, cytokinins and ABA. The levels and ratio of hormones-stimulants and ABA synthesized by *P. funiculosum* strains evidence to the possibility of forming of different types of relationships with plants – mutualistic and/or associative.

Keywords: *Penicillium funiculosum*, phytohormones, auxins, cytokinins, abscisic acid, endophyte, saprotroph.

1. Barker S, Tagu D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J. Plant Growth Regul.* 2000;19(2):144-54.
2. Benjamins R, Scheres B. Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* 2008; 59:443-65. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806. 103805.
3. Bilai VI, editor. [Methods of experimental mycology: reference guide]. Kiev: Nauk. dumka; 1982. Russian.
4. Biliavska LO, Nadkernychna OV, Kopilova OB. [Phytohormones biosynthesis by soil molds *Cladosporium cladosporioides*]. *Mikrobiol Z.* 2017; 79(3):3-13. Ukrainian.
5. Boichuk OB, Zaitseva LM. [Biological methods of determination of native growth regulators]. *Ukr J Bot.* 1977; 34(6):630-6. Ukrainian.
6. Chanclud E, Morel J-B. Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular Plant Pathology.* 2016;17(8):1289-97. doi:10.1111/mpp.12393.
7. Cooper SJ, Ashby AM. Comparison of cytokinin and cytokinin-O-glucoside cleaving beta-glucosidase production in vitro by *Venturia inaequalis* and other phytopathogenic fungi with differing modes of nutrition in planta. *Physiol Mol Plant Pathol.* 1998;53:61-72.
8. Furukawa T, Koga J, Adachi T, Kishi K, Syono K. 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.
9. Gryndler M, Hrselova H, Chvatalova I, Jansa J. The effect of selected plant hormones on in vitro proliferation of hyphae of *Glomus fistulosum*. *Biol Plant.* 1998;41:255-63.
10. Hasan HAH. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Rostlinná Výroba.* 2002;48(3):101-6.

11. 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. doi:10.1016/j.plaphy.2011.03.005.
12. Khan AL, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Al-Farsi Z, Al-Mamari A, Waqas 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. doi:10.1371/journal.pone.0158207.
13. Kholodny Institute of Botany. [Guidelines on determination of plant hormones]. – Kyiv; 1988. Russian.
14. Kulkarni GB, Sanjeevkumar S, Kirankumar B, Santoshkumar M, Karegoudar TB. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Fusarium delphinoides* strain GPK, a causal agent of wilt in chickpea. Appl Biochem Biotechnol. 2013;169:1292-305.
15. Laurans F, Pepin R, Gay G. Fungal auxin overproduction affects the anatomy of *Hebeloma cylindrosporum*–*Pinus pinaster* ectomycorrhizas. Tree Physiol. 2001;21:533-40.
16. Lievens L, Pollier J, Goossens A, Beyaer R, Staal J. Absciscic Acid as Pathogen Effector and Immune Regulator. Front Plant Sci. 2017;8:587. doi:10.3389/fpls.2017.00587.
17. Ludwig-Müller J. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. J Exp Bot. 2011;62(6):1757-73. doi:10.1093/jxb/erq412.
18. Meixner C, Ludwig-Müller J, Miersch O, Gresshoff P, Staehelin C, Vierheilig H. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. Planta, 2005;222(4):709-15.
19. Morrison EN, Emery RJN, Saville BJ. Phytohormone involvement in the *Ustilago maydis*–*Zea mays* pathosystem: relationships between abscisic acid and cytokinin levels and strain virulence in infected cob tissue. PLoS One. 2015;10:e0130945.
20. Murphy AM, Pryce-Jones E, Johnstone K, Ashby AM. Comparison of cytokinin production in vitro by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. Physiol Mol Plant Pathol. 1997;50:53-65.
21. Nakamura T, Tomita K, Kawanabe Y, Murayama T. Effects of auxin and gibberellin on conidial germination in *Neurospora crassa* II: “conidial density effect” and auxin. Plant Cell Physiol. 1982;23:1363-9.
22. Nisa H, Kamili AN, Nawchoo IA, Shafi S, Shameem N, Bandh SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. Microb Pathog. 2015;82:50-9. doi:10.1016/j.micpath.2015. 04.001.
23. Pohleven E, Gogala N. The influence of natural cytokinins on the content of K, P, Ca and Na in the mycelium of the mycorrhizal fungus *Suillus variegatus*. Biol Vestn. 1986;34:79-88.
24. Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse C.W. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. Mol Plant Pathol. 2008;9:339-55.
25. Robinson M, Riov J, Sharon A. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. Appl Environ Microbiol. 1998;64(12):5030-2.

26. Savinskiy SV, Dragovoz IV, Pedchenko VK. [Determination of indole-3-acetic acid and abscisic acid in a plant sample by HPLC]. Fiziol. and Biochem. cult. sol. 1991;23(6):611-9. Russian.
27. Sharaf EF, Farrag AA. Induced resistance in tomato plants by IAA against *Fusarium oxysporum lycopersici*. Pol J Microbiol. 2004;53:111-6.
28. Spence CA, Lakshmanan V, Donofrio N, Bais HP. Crucial roles of abscisic acid biogenesis in virulence of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Front Plant Sci. 2015;6:1-13.
29. Stec N, Banasiak J, Jasiński M. Absciscic acid - an overlooked player in plant-microbe symbioses formation? Acta Biochim Pol. 2016;63(1):53-8. doi:10.18388/abp.2015_1210.
30. Tsavkelova E, Oeser B, Oren-Young L, Israeli M, Sasson Y, Tudzynski B, Sharon A. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. Fungal Genet. Biol. 2012;49:48-57.
31. Vanneste S. Auxin coordinates cell division and cell fate specification during lateral root initiation. Physiol. Plant. 2005;123:139-46.
32. Wani ZA, Mirza DN, Arora P, Riyaz-UI-Hassan S. Molecular phylogeny, diversity, community structure and plant growth promoting properties of fungal endophytes associated with the corms of Saffron plant: an insight into the microbiome of *Crocus sativus* Linn. Fungal Biol. 2016;120(12):1509-24. doi:10.1016/j.funbio.2016.07.011. Epub 2016 Jul 30.
33. 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. doi:10.3390/molecules 170910754.
34. Waqas M, Khan AL, Lee IJ. Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. Journal of Plant Interactions. 2014;9(1):478-87. doi:10.1080/17429145.2013.860562.
35. Yurieva OM, Dragovoz IV, Leonova NO, Ostapchuk AM, Kharkhota MA, Syrchin SO, Kurchenko IM. [Gibberellins of endophytic and saprotrophic *Penicillium funiculosum* strains]. Mikrobiol Z. 2017; 79(5):57-69. Ukrainian.

Отримано 04.10.2017