

## МЕТАБОЛІТИ ГРИБА *SCHAETOMIUM COCHLIODES* PALLISER З ФІТОСТИМУЛЮВАЛЬНОЮ ТА ПРОТЕКТОРНОЮ АКТИВНІСТЮ

Драгатов І. В.<sup>1</sup>, Копилов Є. П.<sup>2</sup>, Йовенко А. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup>Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва  
НААН України,  
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна  
e-mail: a.s.yovenko@gmail.com

**Мета.** Визначити якісний і кількісний склад метаболітів *S. cochliodes* 3250, що зумовлюють його фітостимулювальну активність. **Методи.** Мікробіологічні, фізико-хімічні: спектроденситометрична тонкошарова хроматографія, рідинна хромато-мас-спектрометрія. **Результати.** Показано, що культуральна рідина гриба *S. cochliodes* 3250 за розведень 1:100 – 1:10000 достовірно стимулює накопичення біомаси рослинами озимої пшениці. За результатами специфічного біотестування було виявлено рістстимулювальні речовини ауксинової та гіберелової природи. Їх наявність як у міцелії, так і у культуральній рідині було підтверджено фізико-хімічними методами аналізу. Окрім того, серед екзометаболітів гриба виявлені холестерол та ергостерол, а в міцелії визначено значну кількість фітогормона стимулюючої дії – 2,4-епібрасиноліду (45,71 мкг/г сухої маси). **Висновок.** Присутність серед екзометаболітів *S. cochliodes* 3250 трьох класів сполук фітогормональної природи зумовлює його фітостимулювальну активність; 2,4-епібрасинолід може відігравати важливу роль в індукції захисних реакцій рослин.

**Ключові слова:** *S. cochliodes* 3250, екзометаболіти, специфічне біотестування, хроматографічний аналіз, фітогормони-стимулятори, біологічна активність.

В рослинному організмі існує складна багатокомпонентна сигнальна система, що здійснює рецепцію зовнішніх факторів та активацію, зокрема, захисних систем організму [1]. До найбільш важливих сигнальних систем рослинного організму відносять фітогормональну систему [2]. Ріст і розвиток рослин регулюється великою кількістю ендогенних хімічних сполук, в тому числі ауксинами, цитокінінами, гіберелінами, етиленом, абзцизовою кислотою та брасиносетроїдами [3]. Здатність синтезувати фітогормональні речовини притаманна як рослинам, так і мікроорганізмам: ризосферним, епіфітним і симбіотичним, серед яких на особливу увагу заслуговують ґрунтові гриби.

Ризосферні мікроміцети, що виявляють рістстимулювальну активність, здатні також підвищувати стійкість рослин до стресових факторів та індукувати захисні реакції макроорганізму [4]. Так, мікроміцети, що належать до родів *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Phoma*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Actinomucor*, *Amanita*, здатні до синтезу речовин ауксинової природи [5]. Найбільш широка за спектром група фітогормонів - гіберелінів, що налічує більше ніж

126 сполук. Продукування гіберелінів виявлено серед представників усіх груп мікроорганізмів, але найактивнішими продуцентами є мікроміцети роду *Phaeosphaeria* і *Gibberella fujikuroi* [5, 6]. Екзометаболіти з цитокініноюю активністю виявлено у грибів з родів *Paxillus*, *Rhizopogon*, *Suillus* [7]. Мікроміцети, як синтетики природних форм фітогормонів, здатні підсилювати в рослинах власний захист. Особливу увагу серед стресових метаболітів привертають брасиностероїди, оскільки, окрім їх участі в процесах адаптації рослин, зустрічаються відомості їх впливу на функціонування всієї гормональної системи рослин [8,9].

Фізіологічна активність фітогормонів, що продукуються мікроміцетами, може забезпечуватися їхньою взаємодією з певними рецепторами, що розпізнають фітогормон, специфічно зв'язуються з ним, утворюючи гормон-рецепторний комплекс. Такий комплекс передає сигнал до рослинного геному і потрібний для запуску відповідної фізіологічної програми клітини [4].

Метою даної роботи було визначення якісного і кількісного складу метаболітів *S. cochliodes* 3250, що зумовлюють його фітостимулювальну і протекторну активність.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень був природний штам сумчастого гриба *Chaetomium cochliodes* Palliser 3250, депонований у Всесоюзному науково-дослідному інституті сільськогосподарської мікробіології (зараз Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології Російської академії сільськогосподарських наук).

Гриб культивували протягом 18 діб за температури 25°C в рідкому поживному соєвому середовищі [10]. Титр гриба після ферментації складав  $(3-4) \times 10^5$  колонієутворювальних одиниць (КУО) в 1 мл культуральної рідини.

Загальну рістстимулювальну активність культуральної рідини (КР) мікроміцета *S. cochliodes* 3250 досліджували за допомогою рулонного методу на водній культурі пшениці озимої сорту Смоглянка. Результати враховували на 7 добу за наростанням біомаси рослин та виражали у відсотках відповідно до контролю [11].

Для визначення ауксинової активності застосовували відрізки колеоптилів пшениці сорту Смоглянка [12]. Насіння замочували в кюветах та пророщували за температури 24°C протягом чотирьох діб. Як позитивний контроль використовували розчин індоліл-3-оцтової кислоти (Carl Roth, Німеччина) в концентрації  $10^{-5}$  М. Через 24 години зміну довжини колеоптилів виражали у відсотках відносно контролю (води).

Цитокінінову активність вивчали на ізольованих сім'ядолях огірків сорту Ніжинський 12 [13]. Як позитивний контроль використовували розчин 6-бензиламінопурину (Carl Roth, Німеччина) в концентрації  $10^{-5}$  М. Зміни маси сім'ядолі виражали у відсотках до відповідної маси у контрольному варіанті.

Гіберелову активність вивчали на відрізках мезокотилів гібриду кукурудзи Дніпровський 181 СВ з початковою довжиною листка 15 мм [14]. Як препарат-еталон використовували розчин гіберелової кислоти ГК<sub>3</sub> (Merck, Німеччина) в концентрації  $10^{-5}$  М. Зміни довжини первинного листка ви-

ражали у відсотках приросту до його довжини в контрольному варіанті.

*Брасиностероїдну активність досліджували* в біотесті на корінцях кресс-салату [15]. Зміни довжини первинного корінця виражали у відсотках приросту до його довжини в контрольному варіанті. При проведенні біотестування на проростках кресс-салату як препарат-еталон використовували епін-екстра (розчин епібрасиноліда в спирті 0,025 г/л, «НЭСТ-М», Москва), що містить 2,4-епібрасинолід (в концентраціях  $10^{-9}$  М -  $10^{-11}$  М), як негативний контроль застосовували також індоліл-3-оцтову кислоту (Carl Roth, Німеччина) (в концентраціях  $10^{-4}$  М та  $10^{-11}$  М).

Міцелій гриба відокремлювали від культуральної рідини (КР) фільтруванням через капроновий фільтр і центрифугуванням при 3 тис. об/хв протягом 20 хв.

Для подальшого фізико-хімічного дослідження наважку міцелію гриба 50 г екстрагували 96% етанолом у співвідношенні 1:1 на холоді протягом 1 доби. Етанольний екстракт отримували шляхом центрифугування міцелію при 6 тис. об/хв протягом 20 хв. Вихід екстракту – 60 мл. Маса сухих речовин в етанольному екстракті становила 12,5% від вихідної кількості міцелію у наважці.

Для визначення фітогормонального складу екзометаболітів культуральної рідини гриба етанольний екстракт випарювали досуха на ротаційному випаровувачі. Брасиностероїди екстрагували тричі використання суміші метанол/ацетонітрил (1:1). Об'єднані екстракти теж випарювали досуха на ротаційному випаровувачі. Гормональні сполуки сухого залишку екстракту перерозчиняли в 96% етиловому спирті.

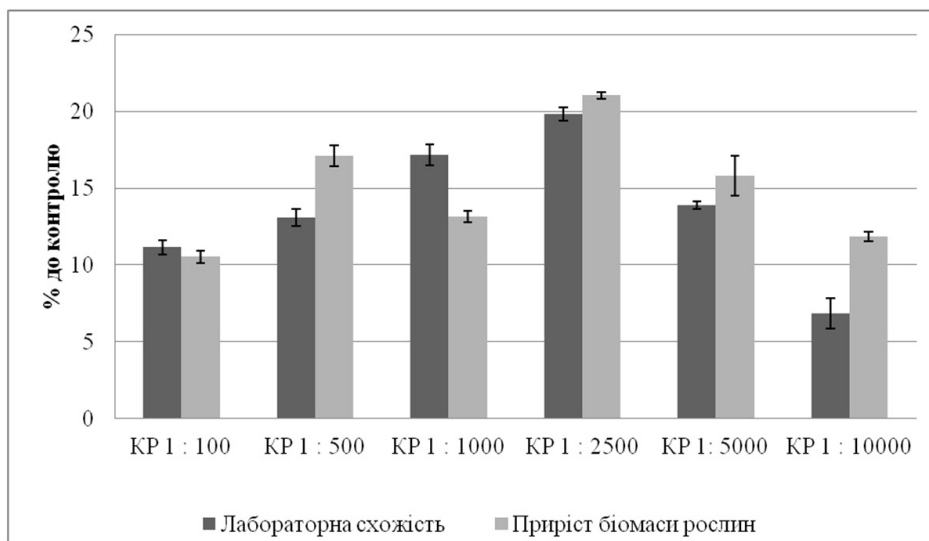
*Для кількісного визначення вмісту ауксинів та цитокінів* застосовували метод кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [15]. Детектування фітогормонів здійснювали за допомогою скануючого спектроденситометра «Сорбфіл» (Росія). Кількість фітогормонів розраховували у мкг/г повітряносухої біомаси гриба та/або мкг/мл культуральної рідини мікроміцета.

*Визначення кількісного вмісту гіберелінів та брасиностероїдів* проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (рідинний хроматограф Agilent Technologies G1956B (США). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, США), швидкість потоку рухомої фази через колонку 0,35 мл/хв, температура термостату колонки 30 °С, об'єм інжекції 3 мкл. Детекцію проводили за використання діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналів при 198 та 210 нм з фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 190-400 нм. Як рухому фазу використовували 0,1% розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі (А) та 0,1% розчин мурашиної кислоти у воді. Елюювання проводили у градієнтному режимі: витримували 20% А впродовж 5 хв, змінювали вміст А від 20 до 80 % за 5 хв з наступним збільшенням А до 100% за 1 хв. Таке співвідношення залишали впродовж 10 хв. Як стандарт порівняння використовували розчин ГК<sub>3</sub> (63492, Aldrich, США).

Розрахунки та статистичну обробку результатів, представлених в роботі, проводили за загальноприйнятими методами. Використовували параметричні критерії нормального розподілу, розраховуючи середнє арифметичне і середнє квадратичне відхилення за рівня значущості менше 0,05.

Аналіз проводили з використанням пакету прикладних програм Microsoft Excel.

**Результати.** Досліджено вплив культуральної рідини *C. cochliodes* 3250 на загальну ростову активність рослин озимої пшениці. Було виявлено стимуляцію наростання біомаси рослин озимої пшениці сорту Смуглянка за дії КР гриба в розведеннях 1:100 – 1:10000.



**Рис. 1.** Загальна фітостимулювальна активність культуральної рідини *C. cochliodes* 3250

Найбільший фітостимулювальний ефект відмічено для розведення КР 1:2500 (рис. 1). При цьому лабораторна схожість підвищувалася на 20%, сира біомаса рослин пшениці збільшувалася на 21% у порівнянні з контрольним варіантом (водогінною водою).

Здатність *C. cochliodes* 3250 продукувати рістстимулювальні речовини оцінювали за використання біотестів, що базуються на специфічних ростових реакціях речовин різних класів гормонів-стимуляторів.

При вивченні ауксинової активності екзометаболітів *C. cochliodes* 3250 показано приріст довжини колеоптилів озимої пшениці сорту Смуглянка з вираженою концентраційною залежністю (рис. 2). Так, обробка відрізків колеоптилів КР гриба стимулювала збільшення довжини колеоптилів в залежності від розведення на 17 - 38% відносно контролю, що свідчить про присутність ауксиноподібних речовин в КР гриба *C. cochliodes* 3250. Обробка колеоптилів пшениці ІОК в концентрації  $10^{-5}$  М викликала збільшення довжини колеоптилів пшениці на 21%. Максимальний прояв біологічної активності спостерігався за розведення 1:5000 та перевищував показник збільшення препарата-еталона (ІОК,  $10^{-5}$  М).

Найбільш виражений вплив ауксину на рослини полягає в стимулюванні росту клітин шляхом розтягнення, що важливо для формування провідних пучків, камбію та утворення додаткових коренів [16].

Дослідження КР гриба *C. cochliodes* 3250 на наявність в ній цитокінінів позитивних результатів не дало.

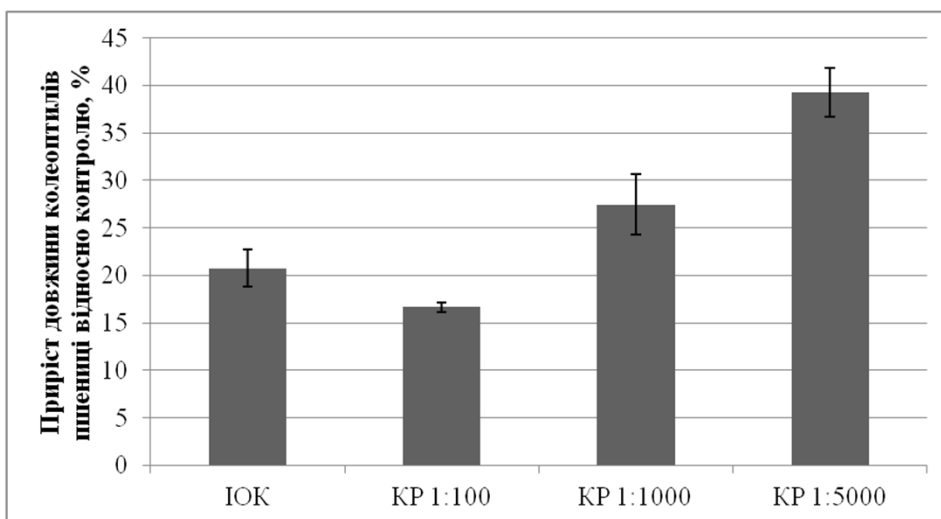


Рис. 2. Приріст довжини відрізків колеоптилів озимої пшениці за дії розведень культуральної рідини *C. cochliodes* 3250

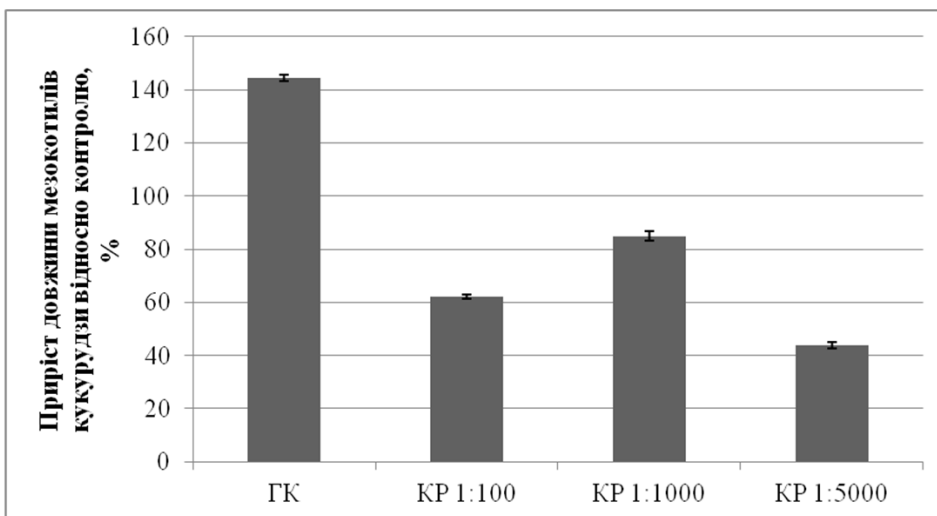


Рис. 3. Приріст довжини мезокотилів кукурудзи за дії культуральної рідини *C. cochliodes* 3250

Водночас приріст довжини відрізків мезокотилів кукурудзи (тест на гібереліни) за використання КР *C. cochliodes* 3250 становив 44 - 85% відносно контролю, що вказує на наявність речовин гіберелової природи. Використання гіберелової кислоти в концентрації  $10^{-5}$  М показало приріст довжини мезокотилів кукурудзи на 144% (рис.3).

У процесі адаптації рослин до несприятливих чинників довкілля задіяні кілька клітинних сигнальних систем, фітогормони і стресові метаболіти, серед яких на увагу дослідників заслуговують брасиностероїди. В специфічних біотестах низькі концентрації брасиностероїдів проявляють набагато вищу активність у порівнянні з ІОК. Вони можуть впливати на широкий спектр морфологічних і фізіологічних реакцій: стимулювати ріст пилкових трубок, змінювати форму листя рослин, пригнічувати ріст

коренів, стимулювати синтез етилену та підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресів [3, 8, 9, 17].

Наявність брасиностероїдів серед екзометаболітів в культуральній рідині гриба підтверджено нами методом специфічного біотесту на корінцях крес-салату (рис. 4.). При цьому як препарат-еталон, так і розведення культуральної рідини (1:100 та 1:100000) давали чітку реакцію на наявність брасиностероїдів. Приріст довжини первинного корінця за обробки *C. cochliodes* 3250 складав 25%, в той час як застосування препарату еталону збільшувало цей показник на 29%. Обробка ІОК ( $10^{-4}$  М) пригнічувала ріст кореня в цій концентрації, тоді як ІОК  $10^{-11}$  М поступово знімало ефект пригнічення.

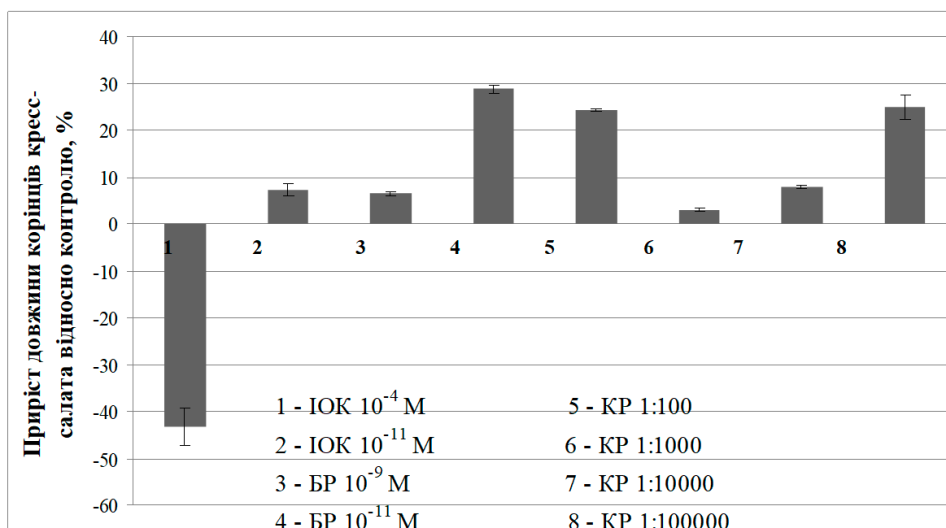


Рис. 4. Вплив ІОК, 2,4-епібрасиноліда та розведень культуральної рідини *C. cochliodes* 3250 на видовження корінців крес-салату сорту *Lola Rossa*

Кількісний аналіз регуляторів росту в КР *C. cochliodes* 3250 та безпосередньо в міцелії підтвердив результати біотестів і показав, що гриб здатен до синтезу ауксинів і гіберелінів (табл. 1). Встановлено, що *C. cochliodes* 3250 продукує ауксини, вміст яких у міцелії складає 24,6 мкг/г сухої маси, у культуральній рідині – 8,7 мкг/мл. Гриб здатен також до синтезу гіберелінів: у міцелії – 301,5 мкг/г сухої міцелію, у культуральній рідині – 56,4 мкг/мл.

Таблиця 1  
Вміст регуляторів росту у міцелії та культуральній рідині гриба *C. cochliodes* 3250

Фітогормональні сполуки та їх прекурсори	Вміст у міцелії, мкг/г сухої біомаси	Вміст у КР, мкг/мл
Індоліл-оцтова кислота	24,6±1,15	8,7±0,003
Гіберелова кислота	301,5±13,44	56,4±2,12
2,4-епібрасинолід	45,71±1,13	0,01098±0,0012
Холестерол	-	7,06±0,05
Ергостерол	-	17,88±0,38

Крім того, у культуральній рідині мікроміцета був виявлений холестерол і ергостерол, а в міцелії – 2,4-епібрасинолід (45,71 мкг/г сухої маси). Наявність холестерола в культуральній рідині може бути свідченням його ролі як прекурсора в синтезі 2,4-епібрасиноліда [18]. Відомо, що ці сполуки сприяють підвищенню стійкості рослин до патогенних мікроорганізмів [8]. Високий вміст стероїдних похідних може свідчити про високу фітостимулювальну та захисну активність гриба.

Серед екзометаболітів культуральної рідини гриба *C. cochliodes* 3250 в значній кількості виявлені індоліл-3-оцтовата та ГК<sub>3</sub> (табл. 1). Речовини цитокінінової природи гриб *C. cochliodes* 3250 не синтезує.

**Обговорення.** Відомо, що мікроорганізми – продуценти фітогормонів та інших фізіологічно активних сполук вступають в асоціативні взаємовідносини з рослинами, утворюючи при цьому рослинно-мікробні системи [19]. Зокрема, встановлено, що синтез фізіологічно активних форм ауксинів притаманний більшості ґрунтових мікроорганізмів, що мають асоціативні зв'язки з рослиною [16]. При цьому цитокініни [20] та ауксини можуть також брати участь у рості і галуженні гіф. Було виявлено два ауксин-індукуючі гени *P. pinaster*, експресія яких підвищується при формуванні ектомікоризного симбіозу [21,22].

Відомі роботи, що свідчать про здатність представників роду *Chaetomium* проявляти ендодітію щодо певних рослин. Так, *C. globosum* здатний до проникнення в тканини тропічних злакових і бобових трав [23, 24]. Нами раніше було показано, що *C. cochliodes* 3250 утворює ендодітні асоціації з рослинами пшениці ярої та сої [25,26].

Можна зробити припущення, що серед сигнальних молекул, що мають важливе значення у формуванні рослино-мікробної асоціації, певну роль відіграють ауксини, які є одними з продуктів метаболізму *C. cochliodes* 3250 (рис 2). Це питання потребує подальшого дослідження.

Не менш важливу роль при взаємодії з рослинами показано для речовин гібереллової природи. Аналіз літературних джерел підтверджує, що в сумарному кількісному відношенні рівень різних гіберелінів набагато вищий у грибів, ніж у рослин [14]. Ефективність практичного використання *C. cochliodes* 3250 обумовлюється здатністю його екзогенних гіберелінів стимулювати ріст стебла, збільшувати кількість квіток та розміри плодів, змінювати форму і величину квіток, прискорювати проростання насіння тощо (рис. 3). Гіберелову кислоту, один з продуктів синтезу *C. cochliodes* 3250, виявлено як в міцелії, так і в культуральній рідині гриба (табл. 1).

За даними літератури відомо, що брасиностероїди проявляють фізіологічну активність в дуже низьких концентраціях ( $10^{-6}$  –  $10^{-12}$ ), що відрізняє їх від інших класів фітогормонів [27]. Екзогенна обробка гормонами ізольованих органів, їх відрізків та цілих рослин викликає стимуляцію росту як за рахунок індукції проліферації клітин, так і за рахунок їх росту розтягненням [9, 18]. Різні брасиностероїди в діапазоні концентрацій  $10^{-12}$  –  $10^{-8}$  стимулювали утворення клітин хлорели [28]. 2,4-епібрасинолід істотно підсилював ділення ізольованих протопластів китайської капусти [29], індукував ембріогенез хвойних та рису [30], органогенез солодкого перцю [31].

Також мікроорганізми, як джерела природних молекул – брасиностероїдів, здатні підсилювати в рослинах захисні реакції. Так, екзогенне застосування брасиностероїдів підвищувало стійкість рослин рису і тютюну до широкого кола патогенів [9]. Аналогічні результати були отримані для рослин огірка, які виявили підвищену стійкість до *F. oxysporum* в результаті посилення утворення перекису водню шляхом впливу на НАДФН-оксидазну експресію генів захисту [32].

Для захисту від фітопатогенів, що подолали конститутивні бар'єри, рослини використовують специфічні індуковані реакції, що вмикаються тільки у відповідь на інфікування специфічним патогеном. Молекули, що індукують стійкість в рослині, є консервативними для багатьох мікроорганізмів, проте є і специфічні [8]. Індуктори, як правило, не виявляють біоцидну дію, а впливають на збудника захворювання через рослину, активуючи її ендогенні захисні механізми [33]. Тобто рослина розпізнає молекули (елісатори) як сигнал, який активує імунну відповідь. Виявлено ряд елісаторних сполук: флагелін, фактор елонгації бактерій, хітин, глюкокани, ксиланази, деякі ліпофільні сполуки, зокрема арахідонова кислота та ергостерол [33-35].

Ергостерол – специфічний індуктор стійкості, який синтезується лише грибами [8]. Показано, що обробка листя винограду сульфатом- $\beta$ -1,3-глюкана, а також ергостеролом та арахідоновою кислотою, що виділені з мікроскопічного гриба *Mortierella hydrophina* активує  $Ca^{2+}$ -залежні сигнальні шляхи, накопичення активних форм кисню, жасмонату, саліцилату та синтез фітоалексинів [36]. Саме ліпідний елісатор ергостерол індукує в рослинному організмі синтез ферментів, що стимулюють накопичення стибелінів, які є основними фітоалексинами. Вони накопичуються за дії патогену та можуть слугувати біохімічним маркером стійкості рослин [33,37].

Індукована ергостеролом стійкість захищає рослину від великої кількості патогенів. Окрім того, ергостерол є попередником рослинних гормонів – брасиностероїдів. Вперше нами була відмічена наявність ергостеролу в культуральній рідині *C. cochliodes* 3250, що може стимулювати захисні реакції макроорганізму. Розпізнавання рецепторами сигнальних молекул (ергостеролу), що продукується сапрофітним грибом, сприяє розвитку індукованої системної стійкості рослин щодо фітопатогенів різної етіології [38].

З попередніх досліджень відомо, що *C. cochliodes* 3250 – активний антагоніст, а механізм впливу на патогенні мікроорганізми був визначений як шлях прямої конкуренції. Можна припустити, що синтез 2,4-епібрасиноліду (табл. 1) також відіграє певну роль саме в процесі конкурентних відносин, стимулюючи ріст кореневої системи рослин та їх потенціал самозахисту.

З літератури відомий синергічний ефект брасиностероїдів та ауксинів, адитивний ефект на ріст розтягненням клітин гіберелінів і брасиностероїдів [39]. Таким чином, можна зробити висновок, що речовини стероїдної природи виконують різноманітні функції при взаємодії з іншими фітогормонами, залучають їх до регуляції метаболізму рослинного організму.



Отже, визначено якісний і кількісний склад екзометаболітів гриба *C. cochliodes* 3250, що зумовлюють не лише його фітостимулювальну активність, а й індукцію захисних реакцій у рослин. Показано здатність гриба до синтезу таких біологічно активних речовин, як ауксини, гібереліни, 2,4-епібрасинолід та попередники його синтезу холестерол та ергостерол. Фітогормони, що продукує *C. cochliodes* 3250, можуть позитивно впливати на ріст і розвиток рослин, відігравати захисну роль у відповіді рослини на несприятливі чинники зовнішнього середовища та брати участь в захисних реакціях рослин при інфікуванні їх фітопатогенами.

## МЕТАБОЛИТЫ ГРИБА *SHAETOMIUM COCHLIODES PALLISER* С ФИТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ И ЗАЩИТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

*Драговоз И.В.<sup>1</sup>, Копылов Е.П.<sup>2</sup>, Йовенко А.С.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного  
НАН Украины,

ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

<sup>2</sup>Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного  
производства НААН Украины,

ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина

e-mail: a.s.yovenko@gmail.com

### Резюме

**Цель.** Определить качественный и количественный состав метаболитов *C. cochliodes* 3250, которые обуславливают его фитостимулирующую активность. **Методы.** Микробиологические, физико-химические: спектроденситометрическая тонкослойная хроматография, жидкостная хромато-масс-спектрометрия. **Результаты.** Показано, что культуральная жидкость гриба *C. cochliodes* 3250 в разведениях 1: 100 - 1: 10000 достоверно стимулирует накопление биомассы растениями озимой пшеницы. По итогам специфического биотестирования были обнаружены ростстимулирующие вещества ауксиновой и гибберелловой природы. Их наличие как в мицелии, так и в культуральной жидкости было подтверждено физико-химическими методами анализа. Кроме того, среди экзометаболитов гриба обнаружены холестерол и эргостерол, а в мицелии определено значительное количество фитогормона стимулирующего действия – 2,4 эпибрасинолида в количестве 45,71 мкг/г сухой массы. **Вывод.** Наличие среди экзометаболитов *C. cochliodes* 3250 трех классов соединений фитогормональной природы обуславливает его фитостимулирующую активность; 2,4-эпибрасинолид может играть важную роль в индукции защитных реакций растений.

**Ключевые слова:** *C. cochliodes* 3250, экзометаболиты, специфическое биотестирование, хроматографический анализ, фитогормоны-стимуляторы, биологическая активность.

## METABOLITES OF *CHAETOMIUM COCHLIODES* PALLISERWITH PHYTOSTIMULATING AND PROTECTIVE ACTIVITY

**Drogovoz I.V.<sup>1</sup>, Kopylov I.P.<sup>2</sup>, Yovenko A.S.<sup>2</sup>**

*1Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine*

*2Institute of Agricultural Microbiology and agricultural production NAAS  
97 Shevchenko str., Chernihiv, 14027, Ukraine  
e-mail: a.s.yovenko@gmail.com*

### Summary

**Arm.** Perform qualitative and quantitative analysis of *C. cochliodes* 3250 metabolites which determine its mold growth stimulating activity. **Methods.** Microbiological, physiological and physical-chemical methods were used, such as TLC spectrodensitometry, liquid chromatography-mass spectrometry. **Results.** We established that cultural liquid of the mold *C. cochliodes* 3250 stimulates winter wheat biomass accumulation during 1:100 – 1:10000 dilution. The substances referred to auxins and gibberellins had been discovered by specific biological tests. Their presence in micellium was confirmed with physical and chemical analysis. Besides cholesterol and ergosterol were detected there. The mold micellium contained 2,4-epibrassinolide in quantity of 45,71 mg/g according to its dry weight. This substance also showed strong stimulation action. **Conclusion.** Three mentioned classes of phytohormonal compounds among *C. cochliodes* 3250 exometabolites have phytostimulating activity; 2,4-epibrassinolide plays a significant role in induction of plants protective reactions.

**Keywords:** *C. cochliodes* 3250, exometabolites, specific biological test, chromatographic analysis, phytohormones stimulants, biological activity.

1. Turetskaya RX. [Endogeneous factors of plant roots formation. In Biology of Plants]. Moscow: Nauka; 1975. Russian.
2. Hooley R. Auxin signaling in with targeted genetics. Plant. Cell. 1998; 10: 1581 – 1584.
3. Dragovoz IV, Yavorska VK, Antoniuk VP, Kurchii BA. [Hormonal substances produced by microorganism association from ginseng roots]. Fiziol. and Biochem. cult. sol. 2009; 41( 5): 393-399. Ukrainian.
4. Kopilov EP. [Soil fungi as biotic factor of influence on plants]. Agricultural microbiology. 2012; 15-16: 7 – 28. Ukrainian.
5. Shimada A., Takeuchi S., Nakajima A. Phytotoxicity of Indole-3-acetic Acid Produced by the Fungus *Pythium aphanidermatum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2000; 64 (1): 187–189.
6. Tsavkelova EA., Klimova SYu., Cherdynitseva TA., Netrusov AI. [Hormones and hormone-like substances of microorganisms: A review]. Applied Biochemistry and Microbiology. 2006; 42( 3): 229-235.
7. Janitor A. Growth of mycelia of phytopathogenic fungi after application of abscisic acid in vitro conditions. Plant Protect. Sci. 2002; 38 (3): 94–97.
8. Tyuterev SL. [Ecologically safe inducers of plant resistance to diseases and physiological stresses]. Journal of plant protection. 2015; 1 (83): 3 -13. Russian.
9. Sharikova FM. [Non-specific plant resistance to stress factors and its regulation]. Ufa: “Guillem” Publisher; 2001. – 160 p. Russian.

10. Biliavska LA, Galagan TA, Boltovskaya EV, Kozyriska VE, Valagurova EV, Sigereva DD, et. al. [Antinematodnye properties of *Streptomyces avermitilis* UCM Ac-2179 and avermectin complex – averkom]. Agrarian Science. 2009; 1: 29-33. Ukrainian.
11. Dragovoz IV, Leonova NO, Zhukova DA, Avdeeva LV. [Exometabolites phytostimulation activity of antagonistic active stain *Bacillus Amyloliquefaciens* IMV B-7404]. Microbiology and biotechnology. 2013; 3: 84-93. Ukrainian.
12. Boychuk OB Zaitsev LM [Application of short segments wheat coleoptiles test to determine the auxin]. Ukr. Botan. Zh. 1977;6:632-636. Ukrainian.
13. Kholodny Institute of Botany. [Guidelines on determination of plant hormones]. – Kyiv; 1988. Russian.
14. Muromtsev GS, Agnistikova VN. [Gibberellins: Monography]. Moscow: Nauka; 1984. Russian.
15. 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):611-619. Russian.
16. Iutinska GA, Ponomarenko SP, editors. [Bioregulation of microbial-plant systems: Monograph]. Kyiv: Nichlava; 2010. 472 p. Ukrainian.
17. Brass D. Biological effects of brassinosteroids. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1999; 34: 339-358.
18. Mandava NB. Plant growth-promoting brassinosteroids. Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol. 1998; 39:23-52.
19. Dragovoz IV, Leonova NO, Biliavska L O, Yavorska VK, Iutynska GO. [Phytohormone production by some free-living and symbiotic soil microorganisms]. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2010; 12: 154- 159. Ukrainian.
20. Gogala N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi . Experientia. 1991; 47: 331-340.
21. Charvet-Candela V, Hitchin S, Ernst D, Sandermann HJr, Marmeisse R, Gay G. Characterization of an Aux/AA cDNA upregulated in *Pinus pinaster* roots in response to colonization by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. New Phytologist. 2002; 154: 769-777.
22. Reddy SM, Pandey AK, Melayah D, Marmeisse R, Gay G. The auxin responsive gene-C61 is up-regulated in *Pinus pinaster* roots following inoculation with ectomycorrhizal fungi. Plant, Cell and Environment. 2003; 26: 681-691.
23. El-Zayat SA. Preliminary studies on laccase production by *Chaetomium globosum* an endophytic fungus in *Glinus lotoides* American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2008; 1(3): 86-90.
24. Ding G., Song Y.C., Chen J.R. et al. Chaetoglobosin U, a cytochalasin alkaloids from endophytic *Chaetomium globosum* IFB-E019. J. Nat. Prod. 2006; 69: 302-304.
25. Kopilov EP. Soil saprophytic fungi - natural regulators of growth, development and plant resistance to pathogen. Palmarium academic publishing, AV Akademikerverlag GmbH&Co.KG. 2013. 104 p.
26. Kopilov EP. Nadkernichny SP. [The efficiency of symbiotic interaction of the fungus *Chaetomium cochliodes* Palliser of soybean plants]. Fiziol. and Biochem. cult. sol. 2008; 40(3): 260-267. Russian.
27. Sakurai A, Fujioka S. The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids. A review. J.Plant Growth Reg. 1993; 13: 147-159

28. Bajguz A, Czerpak R. Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *J.Plant Growth Reg.* 1998; 17: 131-139
29. Sasse JM. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plant.* 1997; 100: 696-701
30. Pullman GS, Zhan Y, Phan BH. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.* 2003; 22: 96-104.
31. Franck-Duchenne M, Wang Y, Tahar SB, Beachy RN. In vitro stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brasinilide. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 1998; 53: 79-84.
32. Li PF, Zhou YH, Xia XJ, Shi K, Chen Z X. Brassinosteroids-induced systemic stress tolerance was associated with increased transcripts of several defence-related genes in the phloem in *Cucumis sativus*. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 June [scholarship 2016 October]; 8( 6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066582>
33. Bekmakhanova NE., Shemshura ON. State of the problem plant resistance to fungal pathogens. *Reports of National academy of sciences of the Republic of Kazakhstan.* 2014; 6 (6): 64-69. Russian.
34. Boller Th., Felix G.A. Renaissance of Elicitors: Perception of elicitors: perception microbe – associated molecular patterns danger signals by pattern – recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biomet.* 2009; 60: 379-406.
35. Shores M., Harman GE. Mastouri F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu. rev. of phytopathology.* 2010; 48: 21-43.
36. Roatti B., Perazzolli M., Gessler C., Pertof I. Abiotic Stresses Affect *Trichoderma harzianum* T-39 – induced resistance to downy mildew in Grapevine. *Phytopathology.* The American Phytopathological Society. 2013; 103(12): 1227-1234.
37. Conrad V. Molecular aspects of defense priming. *Trends in Plant Science.* 2011; 16: 524-531.
38. Pieterse CMJ, Dicke M. Plant interaction with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci.* 2007; 12: 564-569.
39. Katsumi M. Interaction of a brassinosteroid with IAA and  $G_{A3}$  in the elongation of cucumber hypocotyl sections. *Plant Cell Physiol.* 1985; 26: 615-625.

Отримано 18.05.2017