

УДК 579.22:631.147

ПРОДУКУВАННЯ ФІТОГОРМОНІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* І *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ЗА ЇХ СУМІСНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

С. Ф. Козар

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: ismav@online.ua

Мета. Дослідити активність біосинтезу фітогормональних речовин азотфіксувальними бактеріями *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* у чистій і змішаній культурах. **Методи.** Мікробіологічні, хроматографічні, математичні. **Результати.** Встановлено, що за сумісного культивування *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 збільшується вміст гіберелінів і цитокінінів у культуральній рідині досліджуваних мікроорганізмів. Найінтенсивніше у змішаній культурі порівняно з чистою культурою бульбочкових бактерій, зростає вміст ГКз й ізопентеніладеніну. За сумісного вирощування досліджувані діазотрофи інтенсивніше продукували ауксини порівняно з бульбочковими бактеріями сої у чистій культурі, але менше проти чистої культури азоспірил. Найвищий рівень абсцизової кислоти, яка може інгібувати утворення бульбочок, виявлено в культуральній рідині *A. brasilense* 410, в процесі культивування *B. japonicum* М-8 він був меншим. Проте найменшу кількість цього фітогормону виявлено у культуральній рідині діазотрофів за їх сумісного культивування. Найнижче співвідношення ауксини/цитокініни виявлено у культуральній рідині *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 за їх сумісного культивування, що повинно позитивно впливати на формування симбіотичного апарату в процесі взаємодії з рослинами сої. **Висновки.** За сумісного культивування бульбочкових бактерій і азоспірил виявлено збільшення у культуральній рідині мікроорганізмів суми цитокінінів і гіберелінів, зменшення кількості абсцизової кислоти і покращення показників співвідношення ауксини/цитокініни порівняно зі значеннями варіантів з чистими культурами досліджуваних азотфіксувальних бактерій. Аналіз кількісних показників вмісту фітогормонів свідчить про доцільність поєднання *B. japonicum* і *A. brasilense* у змішаній культурі для ефективної інтродукції ризобій в агроценози сої.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, фітогормони, ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота.

Вступ. Азотфіксувальні бактерії за рахунок перетворення атмосферного азоту в доступну форму і постачання його рослинам відіграють важливу роль в агроценозах. Для інтродукції діазотрофів у кореневу зону рослин розробляються мікробні препарати. Водночас одним із перспективних шляхів підвищення їх ефективності є використання як діючої основи біопрепаратів змішаних культур мікроорганізмів: зокрема, для сої можливе створення інокулянтів на основі бактерій, які належать до видів *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense*. За науково обгрунтованого поєднання цих діазотрофів відбувається істотне підвищення їх ростової і

функціональної активності.

Комплексне застосування бульбочкових бактерій сої і азоспірил може сприяти збільшенню кількості й маси бульбочок на коренях рослин, підвищенню активності азотфіксації, що забезпечує зростання врожайності та якості отримуваної продукції.

Важливим чинником, який впливає на ефективність інтродукції азотфіксувальних бактерій в агроценози, є активність біосинтезу діазотрофами фітогормональних речовин, які значною мірою впливають на рослинно-мікробну взаємодію. Низкою досліджень показано, що бульбочкові бактерії у чистій культурі здатні продукувати ауксини, цито-

кініни, гібереліни й абсцизову кислоту. Водночас не вивченою залишається здатність *Bradyrhizobium japonicum* синтезувати фітогормони у змішаних культурах, що сьогодні є актуальним.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Ауксини, цитокініни, гібереліни й абсцизову кислоту відносять до ключових фітогормонів, які відіграють важливу роль у процесах нодуляції та симбіотичної азотфіксації [1; 2].

На органогенез корневих бульбочок діє зміна балансу ауксинів рослини-хазяїна [2; 3]. Індоліл-оцтова кислота впливає на поділ та диференціювання клітин, а також на утворення судинних пучків. Ауксини мікроорганізмів відіграють певну роль у формуванні симбіотичного апарату під час взаємодії з бобовими, але залежності між кількісним вмістом індоліл-оцтової кислоти й азотфіксувальною активністю бульбочок не виявлено [4].

Цитокініни ризобій діють на процеси поділу клітин, що забезпечує утворення бульбочок [5]. Показано, що симбіотичні діазотрофи викликають зміни балансу цитокінінів у кореневій системі рослин, а також безпосередньо у бульбочках [2]. Можна стверджувати, що цитокініни мають істотне значення тому, що за утворення бобово-ризобіального симбіозу співвідношення ауксини/цитокініни зсувається у бік останніх.

Ризобіями можуть синтезуватися гібереліни, які сприяють проростанню насіння, а також росту і розвитку бобових культур, але їх вплив на рослини залежить від багатьох факторів, у т. ч. чинників зовнішнього середовища [2].

Абсцизова кислота інгібує всі фази бульбочкоутворення [3], тому для оптимального протікання цього процесу необхідно, щоб продукування цього фітогормону ризобіями не було інтенсивним.

Мета досліджень — визначення активності біосинтезу фітогормональних речовин азотфіксувальними бактеріями *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* у чистій і змішаній культурах.

Матеріали та методи. Об'єкти досліджень: *B. japonicum* М-8 [6], *A. brasilense* 410 [7], які отримані з колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислово-

го виробництва НААН. Висловлюємо щирю вдячність авторам за люб'язно надані штами.

Культивування мікроорганізмів здійснювали глибинно у періодичній культурі в скляних бутлях на підвісних мікробіологічних качалках за частоти коливань робочої платформи 220 об./хв. і температури $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Використовували оптимізоване живильне середовище для сумісного культивування *B. japonicum* і *A. brasilense* [8; 9]. Посівний матеріал *B. japonicum* і *A. brasilense* вносили у співвідношенні 1:1. Тривалість культивування 72 год.

Для визначення біомаси культуральну рідину бактерій центрифугували впродовж 20 хв. при 9000 об./хв. Клітини бактерій відмивали від залишків екзополімерів фізіологічним розчином тричі, центрифугуючи кожного разу за тих самих умов. Надосадову рідину використовували для визначення фітогормональних сполук; осад клітин суспендували в дистильованій воді, а потім висушували до постійної маси у сушильній шафі при 104°C . Кількість сухої біомаси бактерій визначали ваговим методом.

Позаклітинні фітогормони ауксини, цитокініни, гібереліни і абсцизову кислоту (АБК) виділяли із супернатантів культуральних рідин мікроорганізмів шляхом екстракції такими розчинниками: етилацетатом (ауксини, АБК), рН 3,0; етилацетатом (гібереліни), рН 2,5; н-бутанолом (цитокініни), рН 8,0 [10; 11]. Екстракти випарювали під вакуумом при $40\text{--}45^\circ\text{C}$. Сухий залишок перерозчиняли у 80 %-ному етанолі, переносили у мікропробірки. Отримані екстракти зберігали за температури -24°C і використовували для накопичувальної тонкошарової хроматографії з подальшим проведенням якісного і кількісного визначення фітогормонів методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC/MS).

Попереднє очищення і концентрування фітогормональних екстрактів (накопичувальна тонкошарова хроматографія) проводили 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 у такий спосіб фітогормональні екстракти ауксинів, цитокінінів, гіберелінів і абсцизової кислоти аналізували методом високоефективної рідинної хрома-

тографії (HPLC/MS).

HPLC/MS аналіз фітогормональних екстрактів штамів ґрунтових мікроорганізмів виконано у Центрі колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для порівняння використовували стандартні синтетичні фітогормони *Sigma* (Німеччина) і *Acros Organic* (Бельгія):

– *ауксини*:

IAA — Indole-3-acetic acid, Індол-3-оцтова кислота (ІОК);

ICal — Indole-3-carboxaldehyde, Індол-3-карбоксальдегід;

IC — Indole-3-carbinol, Індол-3-карбінол;

ICA — Indole-3-carboxylic acid, Індол-3-карбоксилова кислота;

IAA-hydr. — Indole-3-acetic acid hydrate, Індол-3-оцтової кислоти гідратид;

IBut — Indole-3-butyric acid, Індол-3-маляна кислота;

– *абсцизову кислоту*:

ABA — abscisic acid; абсцизова кислота;

– *цитокініни*:

Z — Zeatin, зеатин;

ZR — *trans*-Zeatin-riboside, зеатинрибозид;

Kin — Kinetin, кінетин;

IPrA — N⁶-(2-Isopentenyl)adenine, ізопентеніл-аденін;

IPrA_r — N⁶-(2-Isopentenyl)adenosine, ізопентеніл-аденозин;

– *гібереліни*:

Gibberellic acids, гіберелові кислоти ГК₃, ГК₄ та ГК₇.

Якісне і кількісне визначення ауксинів та АБК проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). Як рухомих фаз використовували метанол (А) та 1 % розчин оцтової кислоти у воді (В). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (2,1 мм × 150 мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку — 0,25 мл/хв, температура термостату — 30 °С, об'єм інжекції — 2 мкл. Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв — А (30 %) : В (70 %); 25 хв — А (30 %) : В (70 %); 35 хв — А (100 %) : В (0 %); 35 хв — А (100 %) : В (0 %).

Детекцію сполук проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу за 254 та 280 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 191–700 нм. Для визначення молекулярних мас досліджуваних пігментів використовували мас-спектрометричний детектор Agilent G1956B (Agilent Technologies, USA). Іонізацію проводили в режимі ESI та APCI з фіксацією позитивних іонів у режимі SCAN в діапазоні 100–1200 m/z. Калібрування здійснювали з використанням стандартних розчинів ауксинів та АБК.

Якісне і кількісне визначення цитокінінів проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). Як рухомих фаз використовували метанол (А) та 0,1 % розчин мурашиної кислоти у воді (В). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (2,1 мм × 150 мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку — 0,25 мл/хв, температура термостату — 30 °С, об'єм інжекції — 2 мкл. Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв — А (20 %) : В (80 %); 25 хв — А (70 %) : В (30 %); 35 хв — А (100 %) : В (0 %); 35 хв — А (100 %) : В (0 %).

Детекцію сполук проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу за 254 та 280 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 191–700 нм. Для визначення молекулярних мас досліджуваних фітогормонів використовували мас-спектрометричний детектор Agilent G1956B (Agilent Technologies, USA). Іонізацію проводили в режимі ESI та APCI з фіксацією позитивних іонів у режимі SCAN в діапазоні 100–1200 m/z. Калібрування проводили з використанням стандартних розчинів цитокінінів.

Якісне і кількісне визначення гіберелінів здійснювали методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) та мас-спектрального детектора Agilent G1956B. Розділення здійснювали на колонці Zorbax SB-C18 (2,1 мм × 150 мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, США), швидкість потоку рухомих фаз через колонку — 0,35 мл/хв, температура термостату колонки — 30 °С, об'єм інжекції — 3 мкл. Елюювання проводили у системі ацетонітрил (А) / вода + мурашина кислота.

слота (В) у градієнтному режимі: витримували 20 % А впродовж 5 хв, далі змінювали вміст А градієнтно від 20 до 80 % за 10 хв з наступним збільшенням А до 100 % за 0,5 хв. Таке співвідношення залишали впродовж наступних 8,5 хв.

Детекцію гіберелінів здійснювали за допомогою діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу за довжини хвилі 198 та 210 нм. Мас-спектрометричний аналіз проводили з реєстрацією позитивних і негативних іонів у співвідношенні m/z (маса-заряд) у діапазоні 190–400 нм. Флуоресцентний детектор використовували у режимі екстинції за 210 нм, емісії — за 410 нм.

Молекулярні маси досліджених гіберелінів визначали за допомогою одноквадратного мас-спектрометричного детектора. Іонізацію проводили в режимі електростатичного розпилення (ESI) з формуванням негативних іонів. Детектування іонів здійснювали у режимах SCAN та SIM (selected ion monitoring) у діапазоні 200–500 m/z . ГК₃, ГК₄ та ГК₇ реєстрували шляхом порівняння часу утримання, значень молекулярних мас іонів, спектральних характеристик отриманих піків. Кількісний вміст ГК₃, ГК₄ і ГК₇ визначали методом зовнішньої калібровки з використанням режиму SIM за іонами 345, 331 та 329 m/z .

Математичну обробку даних здійснювали за використання програми Excel.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що найбільшу кількість β -індоліл-3-оцтової кислоти продукують азоспірили у

чистій культурі (табл. 1). Бульбочкові бактерії сої продукували цей ауксин у найменшій кількості. У змішаній культурі *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 інтенсивніше продукували ІОК, порівняно з чистою культурою бульбочкових бактерій, але значно менше, порівнюючи з азоспірилами. Як *B. japonicum* М-8, так і *A. brasilense* 410 у чистих культурах продукували індол-3-оцтової кислоти гідратид. При цьому бульбочкові бактерії інтенсивніше продукували цей ауксин, а за сумісного культивування діазотрофів його не виявлено.

Азоспірили інтенсивно продукували індол-3-карбоксілову кислоту. Бульбочкові бактерії сої синтезували цей фітогормон у більшій кількості за вирощування у чистій культурі. Не виявлено утворення індол-3-карбоксалдегіду за вирощування *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 у чистих культурах, але за сумісного культивування цих мікроорганізмів його виявлено у кількості 3,69 мкг/г сухої біомаси мікроорганізмів.

За культивування бульбочкових бактерій сої і азоспірил як у чистій, так і в змішаній культурі не утворювалися індол-3-карбінол й індол-3-масляна кислота. Сумарний рівень синтезу досліджуваних ауксинів був найвищим за культивування азоспірил, меншим — бульбочкових бактерій і найменшим за культивування цих мікроорганізмів у змішаній культурі. Водночас слід взяти до уваги, що згідно з літературними даними [2; 12] для утворення ефективної симбіотичної системи важливим є не стільки кількість ауксинів,

Таблиця 1. Результати аналізу кількісного вмісту ауксинів, що синтезуються мікроорганізмами

Варіанти досліджу	Ауксини, мкг/г абсолютно сухої біомаси					
	IAA ¹	IAA-hydr. ²	ICA ³	ICal ⁴	IC ⁵	IBut ⁶
<i>B. japonicum</i> М-8	0,85	38,67	3,04	не виявлено	не виявлено	не виявлено
<i>A. brasilense</i> 410	620,90	14,81	40,61	не виявлено	не виявлено	не виявлено
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	5,14	не виявлено	1,71	3,69	не виявлено	не виявлено

Примітки: ¹IAA – Індол-3-оцтова кислота (ІОК);

²ICal – Індол-3-карбоксалдегід;

³IC – Індол-3-карбінол;

⁴ICA – Індол-3-карбоксілова кислота;

⁵IAA-hydr. – Індол-3-оцтової кислоти гідратид;

⁶IBut – Індол-3-масляна кислота.

скільки співвідношення ауксини/цитокініни: чим воно менше, тим інтенсивніше утворюються бульбочки. Тому Nod-фактори ризобій інгібують транспорт ауксину, що необхідно для зміни співвідношення гормонів [5].

Відомо, що абсцизова кислота інгібує всі фази утворення бульбочок на корінні бобових культур [5], а також процес фіксації азоту [13]. Найвищий рівень цього гормону виявлено в культуральній рідині *A. brasilense* 410, за культивування *B. japonicum* М-8 він був у 2,5 рази меншим. Проте найменшу кількість абсцизової кислоти виявлено у культуральній рідині діазотрофів за їх сумісного культивування (табл. 2).

Таблиця 2. Результати аналізу кількісного вмісту абсцизової кислоти, що синтезуються мікроорганізмами

Варіанти дослідів	Абсцизова кислота, мкг / г сухої біомаси
<i>B. japonicum</i> М-8	5,1
<i>A. brasilense</i> 410	12,5
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	4,4

Важливу роль у формуванні, а також у функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу відіграють гібереліни [14]. Найвищий рівень ГК₃ і загальної кількості гіберелінів виявлено у культуральній рідині *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 за їх сумісного культивування (табл. 3).

У чистій культурі як бульбочкових бактерій, так і азоспірил уміст ГК₃ містився у слідових кількостях. ГК₄ продукували всі досліджувані мікроорганізми як у чистій, так і в змішаній культурі, хоча у чистій культурі

азоспірил рівень цього гібереліну був найвищим.

Таблиця 3. Результати аналізу кількісного вмісту гіберелінів, що синтезуються мікроорганізмами

Варіанти дослідів	Гібереліни, мкг / г сухої біомаси	
	гіберелова кислота (ГК ₃)	гіберелова кислота (ГК ₄)
<i>B. japonicum</i> М-8	<0,1	3,13
<i>A. brasilense</i> 410	<0,1	5,37
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	270,51	2,51

Відомо, що в регуляції процесів поділу клітин, який ініціює утворення бульбочок на корінні, беруть участь цитокініни [2; 15; 16]. Виявлено продукування ізопентеніл-аденіну штамом *B. japonicum* М-8 як у чистій культурі, так і за культивування сумісно з азоспіралами. Штам *A. brasilense* 410 продукував зеатин і зеатин рибозид. Не виявлено вмісту кінетину й ізопентеніл-аденозину у культуральній рідині бульбочкових бактерій сої і азоспірил як у чистій, так і змішаній культурі. Сума цитокінінів була найбільшою у варіанті з сумісним культивуванням діазотрофів (табл. 4).

Як зазначалося вище, необхідним для утворення ефективною симбіотичної системи є співвідношення ауксини/цитокініни. Особливо важливо, щоб воно було низьким на ранніх стадіях інфікування коріння. Найнижче співвідношення ауксини/цитокініни виявлено у культуральній рідині *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 за їх сумісного культивування. У варіанті з культивуванням

Таблиця 4. Результати аналізу кількісного вмісту цитокінінів, що синтезуються мікроорганізмами

Варіанти дослідів	Цитокініни, мкг/г сухої біомаси				
	зеатин	зеатин-рибозид	кінетин	ізопентеніл-аденін	ізопентеніл-аденозин
<i>B. japonicum</i> М-8	не виявлено	не виявлено	не виявлено	2,37	не виявлено
<i>A. brasilense</i> 410	0,42	2,99	не виявлено	не виявлено	не виявлено
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	не виявлено	не виявлено	не виявлено	12,10	не виявлено

бульбочкових бактерій сої у чистій культурі воно більше в 20 разів, а в культуральній рідині азоспірил, вирощених у чистій культурі, — у 220 разів (табл. 5). Зважаючи на ці показники, утворення корневих бульбочок повинно інтенсивніше відбуватися при застосуванні інокулюму для обробки насіння сої, отриманого за сумісного застосування *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410.

Таблиця 5. Результати аналізу кількісного співвідношення ауксини/цитокініни, що синтезуються ґрунтовими мікроорганізмами

Варіанти дослідів	Співвідношення ауксини/цитокініни
<i>B. japonicum</i> М-8	17,9
<i>A. brasilense</i> 410	198,2
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	0,9

Висновки. За сумісного культивування бульбочкових бактерій і азоспірил виявлено збільшення у культуральній рідині мікроорганізмів суми цитокінінів і гіберелінів, зменшення кількості абсцизової кислоти і покращення показників співвідношення ауксини/цитокініни у порівнянні зі значеннями варіантів з чистими культурами досліджуваних азотфіксувальних бактерій. Аналіз кількісних показників вмісту фітогормонів показує доцільність поєднання *B. japonicum* і *A. brasilense* у змішаній культурі для ефектвної інтродукції ризобій в агроценози сої.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Волкогон В. В., Сальник В. П. Значення регуляторів росту рослин у формуванні активних азотфіксувальних симбіозів та асоціацій. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2005. Т. 37, № 3. С. 187–197.
2. Коць С. Я., Гришук О. О. Фітогормони у формуванні та функціонуванні симбіотичних взаємовідносин бобових рослин і бульбочкових бактерій. *Физиология растений и генетика*. 2015. Т. 47, № 3. С. 187–206.
3. Bano A., Harper J. E., Auge R. M., Neuman D. S. Changes in phytohormone levels following inoculation of two soybean lines differing in nodulation. *Functional Plant Biology*. 2002. No 29. P. 965–974.
4. Wu C., Dickstein R., Cary A. J., Norris J. H. The auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl) phtha-

amic acid elicits pseudonodules on nonnodulating mutants of white sweetclover. *Plant Physiol*. 1996. Vol. 110, No 2. P. 501–510. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.501>

5. Ferguson B. J., Mathesius U. Signaling interactions during nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2003. Vol. 22, N 1. P. 47–72. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0032-9>

6. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8 Kirchner, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої: пат. 39545А Україна. МПК6 С12N1/20, С12R1/41, С05F11/08, А01N63/00, А01P21/00, А01С1/06, М. З. Толкачов, В. П. Патика, І. О. Каменєва, Л. Ю. Грітчина; заявник і патентовласник: Південний філіал Інституту сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук. № 2000105680; заявл. 06.10.2000; опубл. 15.06.2001, Бюл. № 5.

7. Штам бактерій *Azospirillum brasilense* для виробництва бактеріального добрива під гречку: пат. 40542 Україна. МПК С05F11/08, С12N1/20, В. І. Лохова, О. В. Надкернична; заявник і патентовласник: Український науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології УААН. №4323845/SU; заявл. 02.11.1987; опубл. 16.07.2001, Бюл. № 6.

8. Козар С. Ф. Вплив джерел біогенних елементів на ріст *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* за їх сумісного культивування. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2013. Вип. 18. С. 75–86.

9. Козар С. Ф. Оптимізація середовища для сумісного культивування *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense*. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2014. Вип. 19. С. 27–32.

10. Методические рекомендации по определению фитогормонов. Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. 78 с.

11. Lee I. J., Foster K. R., Morgan P. W. Photoperiod control of gibberellin levels and flowering in sorghum. *Plant Physiol*. 1998. Vol. 116, No 3. P. 1003–1011. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.1003>

12. Mulder L., Hogg B., Bersoult A., Cullimore J. V. Integration of signalling pathway in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum*. 2005. Vol. 123, No 2. P. 207–218. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00448.x>

13. Gonzalez E. M., Galvez L., Arrese-Igor C. Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany*. 2001. Vol. 52, No 355. P. 285–293. <https://doi.org/10.1093/jxb/52.355.285>

14. Giles E. D., Oldroyd G. E., Downie J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant*

Biology. 2008. Vol. 59. P. 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>

15. Гришук О. О., Волкогон М. В., Коць С. Я. Здатність штамів та Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності до синтезу фітогормонів в умовах *in vitro*. *Сільськогосподарська*

мікробіологія: здобутки та перспективи. Чернівці. ЦНІТІ. 2011. С. 168–173.

16. Cooper J. B., Long S. R. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *The Plant Cell*. 1994. Vol. 6. No 2. P. 215–225. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.2.215>

Отримано 06.11.2018

UDC 579.22:631.147

PRODUCTION OF PHYTOHORMONES OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* AND *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* UNDER THEIR SIMULTANEOUS CULTIVATION

S. F. Kozar

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv
e-mail: ismav@online.ua

Objective. Investigate the activity of biosynthesis of phytohormonal substances with nitrogen-fixing bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in pure and mixed culture.

Methods. Microbiological, chromatographic, and mathematical. **Results.** It has been established that the simultaneous cultivation of *B. japonicum* M-8 and *A. brasilense* 410 increases the content of gibberellins and cytokinins in the culture fluid of the test microorganisms. The content of gibberellic acid and isopentenylidene has increased most intensively in mixed culture compared with the pure culture of rhizobia. In the course of co-cultivation, the studied diazotrophs more intensively produced auxins compared to soybean rhizobia in pure culture, but less compared to pure culture of azospirilla. The highest level of abscisic acid that can inhibit the formation of nodules was found in *A. brasilense* 410 culture fluid, and it was lower when cultivating *B. japonicum* M-8. However, the smallest amount of this phytohormone was found in the culture liquid of diazotrophs under their co-cultivation. The lowest ratio of auxin/cytokinin was found in *B. japonicum* M-8 and *A. brasilense* 410 culture fluid under their co-cultivation, which should positively influence the formation of a symbiotic system when interacting with soybean plants. **Conclusion.** A combination of cultivating rhizobia and azospirilla showed an increase in the amount of cytokinins and gibberellins in the culture fluid of the microorganisms, a decrease in the amount of abscisic acid and improvement in the auxin/cytokinin ratio compared to the values of the pure cultures of the nitrogen-fixing bacteria studied. An analysis of the quantitative parameters of the content of phytohormones suggests the feasibility of combining *B. japonicum* and *A. brasilense* in a mixed culture for the effective introduction of rhizobia in soybean agrocenosis.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, phytohormones, auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid.

REFERENCES

1. Volkohon, V. V., & Salnyk, V. P. (2005). Znachennya rehulyatoriv rostu roslyn u formuvanni aktyvnykh azotfiksuvalnykh symbioziv ta asotsiatsiy [Importance of plant growth regulators in the formation of active nitrogen fixing symbiosis and associations]. *Fyzyolohyya y byokhymyya kulturnykh rastenyu*, 37(3), 187–197 [in Ukrainian].

2. Kots, S. Ya., & Hryshchuk, O. O. (2015). Fitohormony u formuvanni ta funktsionuvanni symbiotychnykh vzayemovidnosyn bobovykh roslyn i bulbochkovykh bakteriy [Phytohormones in the formation and functioning of the symbiotic relationship between legumes and bulbous bacteria]. *Fyzyolohyya rastenyu y henetyka*, 47(3), 187–206 [in Ukrainian].

3. Bano, A., Harper, J. E., Auge, R. M., & Neuman, D. S. (2002). Changes in phytohormone levels following inoculation of two soybean lines differing in nodulation. *Functional Plant Biology*, 29, 965–974.
4. Wu, C., Dickstein, R., Cary, A. J., & Norris, J. H. (1996). The auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl) phthalamic acid elicits pseudonodules on nonnodulating mutants of white sweetclover. *Plant Physiol*, 110(2), 501–510. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.501>
5. Ferguson, B. J., & Mathesius, U. (2003). Signaling interactions during nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(1), 47–72. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0032-9>
6. Pat. 39545A UA. МПК6 C12N1/20, C12R1/41, C05F11/08, A01N63/00, A01P21/00, A01C1/06. Strain of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* M-8 Kirchner, being used for preparation of bacterial agent increasing soya crop yield, Tolkachov, M. Z., Patyka, V. P., Kamenieva, I. O., & Hritchina, L. Y., publ. 15.06.2001 [in Ukrainian].
7. Pat. 40542 UA, МПК C05F11/08, C12N1/20. Bacterial strain *Azospirillum brasilense* for producing bacterial fertilizer for buckwheat, Lokhova, V. I., Nadkernychna, O. V., publ. 16.07.2001 [in Ukrainian].
8. Kozar, S. F. (2013). Vplyv dzherel biohenykh elementiv na rist *Bradyrhizobium japonicum* i *Azospirillum brasilense* za yikh sumisnoho kultyvuvannya [Optimization of the environment for cultivating *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*]. *Silskogospodarska mikrobiologia*, 18, 75–86 [in Ukrainian].
9. Kozar, S. F. (2014). Optymizatsiya seredovyscha dlya sumisnoho kultyvuvannya *Bradyrhizobium japonicum* i *Azospirillum brasilense* [Optimization of the environment for co-cultivating *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*]. *Silskogospodarska mikrobiologia*, 19, 27–32 [in Ukrainian].
10. *Metodicheskiye rekomendatsii po opredele-niyu fitogormonov* (1988). [Guidelines for the determination of phytohormones]. Kyiv: In-t botaniki AN USSR, 78 [in Russian].
11. Lee, I. J., Foster, K. R., & Morgan, P. W. (1998). Photoperiod control of gibberellin levels and flowering in sorghum. *Plant Physiol*, 116(3), 1003–1011. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.1003>
12. Mulder, L., Hogg, B., Bersoult, A., & Cullimore, J. V. (2005). Integration of signalling pathway in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum*, 123(2), 207–218. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00448.x>
13. Gonzalez, E. M., Galvez, L., & Arrese-Igor, C. (2001). Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany*, 52, 285–293. <https://doi.org/10.1093/jxb/52.355.285>
14. Giles, E. D., Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
15. Hryshchuk, O. O., Volkohon, M. V., & Kots, S. Ya. (2011). Zdatnist shtamiv ta Tn5-mutantiv *Bradyrhizobium japonicum* riznoyi efektyvnosti do syntezu fitohormoniv v umovakh in vitro [The ability of strains and Tn5 mutants of *Bradyrhizobium japonicum* of varying efficacy to the synthesis of phytohormones in vitro]. *Silskogospodarska mikrobiologia: zdobutky ta perspektyvy. Chernihiv. TSNITI*, 168–173 [in Ukrainian].
16. Cooper, J. B., & Long, S. R. (1994). Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *The Plant Cell*, 6(2), 215–225. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.2.215>

Received 06.11.2018