

СИНТЕЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ГІБЕРЕЛІНІВ ГК₄ І ГК₇ МІКРООРГАНІЗМАМИ

Т.П. Пирог^{1,2}, Д.В. Гаврилкіна¹, Н.О. Леонова²,
Г.О. Іутинська², Т.А. Шевчук²

¹Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна
E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Серед великого розмаїття (понад 130) гіберелінів (ГК) біологічна активність притаманна ГК₁, ГК₃, ГК₄ і ГК₇, проте мікробному синтезу двох останніх у літературі приділяється значно менше уваги, ніж ГК₃. Однією з причин цього є невисока концентрація синтезованих мікроорганізмами гіберелінів ГК₄ і ГК₇ (на порядки нижча, ніж ГК₃, мікробний синтез якого реалізований у промисловому масштабі). Разом з тим висока біологічна активність ГК₄ і ГК₇ (у деяких випадках вища, ніж ГК₃) зумовила останніми роками підвищення інтересу дослідників до цих гіберелінів. В огляді підсумовано дані літератури про утворення ГК₄ і ГК₇ як асоційованими з рослинами бактеріями і грибами, так і мікроорганізмами, які не перебувають у такій взаємодії, а також про підвищення синтезу цих гіберелінів мутантними та генно-інженерними штамами *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). Поодинокі поки що повідомлення про інтенсифікацію мікробного синтезу гіберелінів ГК₄ і ГК₇ (збільшення концентрації до 500–700 мг/л, що на порядки вище порівняно з вихідними штамами) засвідчують потенційну можливість реалізації технологій одержання цих біологічно активних гіберелінів у промисловому масштабі.

Ключові слова: фітогормони, мікробний синтез, гібереліни ГК₄ і ГК₇.

У 2015 р. світовий ринок регуляторів росту рослин був оцінений у 1,6 млрд доларів. З 2015 по 2020 рр. прогнозується його зростання на 3,6 % (до 1,91 млрд доларів) [1]. Найбільші обсяги випуску на ринку регуляторів росту рослин припадають на гібереліни, споживання яких у світі становить приблизно 60 т на рік [1].

На теперішній час здатність до синтезу фітогормонів гіберелової природи встановлена для широкого спектру живих організмів. Рослини, бактерії, гриби і дріжджі синтезують понад 130 різних форм гіберелінів (ГК), проте лише деяким з них притаманна висока біологічна активність – ГК₁, ГК₃, ГК₄ та ГК₇, інші ж гібереліни фізіологічно неактивні та є попередниками біосинтезу інших форм [2].

Гіберелін ГК₃ є першим фітогормоном, одержуваним мікробним синтезом, і ця технологія почала розроблятися понад 50 років тому. З того часу і дотепер як промислові продуценти ГК₃ використовують гриби *Fusarium moniliforme* та *Gibberella fujikuroi* [3, 4]. Якщо у перших технологіях гли-

бинного культивування концентрація ГК₃ не перевищувала 0,3–0,5 г/л, то нині вона досягає 5–15 г/л.

Зазначимо, що високою біологічною активністю характеризується і гіберелін ГК₄, який сприяє утворенню і росту плодів як фруктів (яблука, виноград), так і овочів (помідори, горох) [5]. Спектр дії гібереліну ГК₇ ширший, а біологічна активність у багатьох випадках вища порівняно з такою ГК₃ і ГК₄.

Незважаючи на те, що гібереліни ГК₄ і ГК₇ за біологічною активністю не поступаються гібереліну ГК₃, промислового виробництва для них не розроблено. Це зумовлено такими причинами: вони синтезуються у надзвичайно низьких концентраціях, що зумовлює високу вартість препаратів; як правило, синтезуються у вигляді суміші гіберелінів ГК₄ і ГК₇, в яких співвідношення ГК₄/ГК₇ сильно варіює; виділення індивідуальних препаратів ГК₄ і ГК₇ з суміші ускладнене через їх дуже близьку полярність [6].

У нещодавно опублікованому нами огляді [7] ми підсумували відомі дані літератури щодо синтезу ауксинів та цитокінінів як асоційованими з рослинами мікроорганізмами (ризосферними, ендofітними, азотфіксувальними, фітопатогенними), так і тими, які не беруть участі у такій взаємодії, а також розглянули шляхи інтенсифікації мікробного синтезу гібереліну ГК₃ за умов глибинного і твердо-фазового культивування продуцентів.

Мета даного огляду – узагальнення сучасних даних літератури щодо синтезу різними мікроорганізмами біологічно активних гіберелінів ГК₄ та ГК₇.

Утворення гіберелінів ГК₄ і ГК₇ ризобактеріями. Ризобактерії здатні стимулювати ріст рослин або безпосередньо (в результаті фіксації азоту, солюбілізації фосфатів, хелатування іонів заліза та синтезу фітогормонів), або опосередковано (пригнічення фітопатогенів, індукція стійкості до фітопатогенів та стресових умов). В іноземній літературі такі бактерії називаються PGPR-бактеріями (plant growth promoting rhizobacteria) [8, 9]. Вони поділяються на 4 групи залежно від близькості до коренів: ризосферні (існують у ґрунті біля коріння); ризопланові (колонізують поверхню кореня); ендofіти (мешкають у кореневій тканині); симбіотичні азотфіксатори, до яких належать ризобії, або бульбочкові (перебувають у симбіозі з бобовими рослинами), та представники роду *Frankia* (симбіоз з вільхою).

Симбіотичні азотфіксатори. Першою згадкою про здатність цих бактерій синтезувати гібереліни є робота Atzorn зі співавт. [10]. Встановлено, що *Rhizobium phaseoli* (мікосимбіонт квасолі *Phaseolus vulgaris*) утворює гібереліни ГК₁, ГК₄, ГК₉ і ГК₂₀. Рівень синтезу цих фітогормонів у 10 диких та мутантних (*nod*, *fix*) штамів *R. phaseoli* становив (нг/л): ГК₁ – 142–638; ГК₄ – 33–355; ГК₉ – 31–83; ГК₂₀ – 37–129. Оскільки нездатні до утворення бульбочок і фіксації азоту мутанти також синтезували фітогормони, було зроблено висновок про те, що азотфіксувальна здатність не пов'язана з фітогормональною активністю.

У 2014 р. з'явилося повідомлення [11] про активність гіберелін-оксидаз бактероїдів *Bradyrhizobium japonicum* – мікосимбіонтів сої. Автори встановили, що штам *B. japonicum* USDA 110 з невеликою ефективністю здатний перетворювати ГК₁₄ на ГК₄, проте кількісного визначення гіберелінів не проводили.

У 2017 р. Nett із співавт. [12] виявили у складі оперону, відповідального за синтез гіберелінів у ризобій (*Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*) додатковий ген, що кодує синтез цитохром Р450 (СYP 115) монооксигенази, яка функціонує як гіберелін-3-оксидаза, що каталізує перетворення гібереліну ГК₉ на біологічно активний ГК₄. Ці дані дали змогу авторам припустити, що деякі ризобактерії здатні до утворення гібереліну ГК₄.

Зазначимо, що на теперішній час у доступній літературі нам не вдалося знайти більше відомостей про утворення гіберелінів ГК₄ і ГК₇ у симбіотичних азотфіксаторів.

Наші дослідження штамів *Bradyrhizobium japonicum* з різною симбіотичною активністю показали, що вони синтезують біологічно активні гібереліни ГК₃ і ГК₄, а також слідові кількості ГК₇. Серед активних штамів ризобій найбільшу кількість гіберелінів синтезував штам УКМ В-6018 (198,14 мкг/л ГК₃ і 6,30 мкг/л ГК₄) та УКМ В-6035 (170,83 мкг/л ГК₃ і 6,66 мкг/л ГК₄). Зазначимо, що й штам 21110 з низькою азотфіксувальною здатністю утворював 290 мкг/л ГК₃ і 6,1 мкг/л ГК₄.

Ризосферні ризобактерії. PGPR-бактерії *Bacillus pumilus* та *Bacillus licheniformis*, виділені з ризосфери вільхи, синтезують ГК₄ у кількості $8 \cdot 10^3$ – $12 \cdot 10^3$ нг/л, а також ГК₁, ГК₃ та ГК₂₀ у концентраціях від $2 \cdot 10^3$ до $15 \cdot 10^4$ нг/л [13].

Штами *Bacillus cereus* MJ-1, *Bacillus macroides* CJ-29 і *B. pumilus* CJ-69, ізолювані з ризосфери червоного перцю, утворюють біологічно активні гібереліни ГК₁, ГК₃, ГК₄ і ГК₇ у концентрації 17–87 нг/л і низку біологічно неактивних гіберелінів. Автори зазначають, що стимуляція росту рослин зумовлена синтезом саме гіберелінів, оскільки у культуральній рідині досліджуваних штамів не виявлені інші фітогормони [14].

У 2017 р. з ризосфери сої було виділено штам *Bacillus aryabhatai* SRB02, який продукував невеликі кількості біологічно активних гіберелінів (від 1 до 31 нг/л) [15].

Показано [16], що штам *Pseudomonas putida* Н-2-3 значно збільшував довжину і вагу стебла, а також вміст хлорофілу в листі гіберелін-дефіцитного мутанта рису (*Waito*-С). Автори пов'язують це зі здатністю *P. putida* Н-2-3 до синтезу гіберелінів, зокрема ГК₄, концентрація якого була найвищою і становила 156 нг/л.

Нещодавно [17] було вперше встановлено здатність бактерій *Enterococcus faecium* до синтезу гіберелінів. Штам *E. faecium* LKE12, ізолюваний з ризосфери східної дині (*Cucumis melo* L.), стимулював ріст рослин рису завдяки утворенню кількох біологічно активних гіберелінів, серед яких кількісно переважав ГК₄ (40,4 нг/л).

Ізолят з ризосфери перцю (*Capsicum annuum* L.), ідентифікований як *Serratia nematodiphila* PEJ1011, синтезував ГК₄ у кількості 8650 нг/л, а також ГК₉ (1640 нг/л) і ГК₂₀ (6210 нг/л) [18]. Інокуляція *S. nematodiphila* PEJ1011 рослин перцю у стресових низькотемпературних умовах сприяла накопиченню ендогенного ГК₄ у тканинах рослин.

Ендофіти. Ще у 2005 р. Schulz і Boyle [19] встановили, що 51% біологічно активних метаболітів синтезуються ендофітами і тільки 38% – представниками іншої мікробіоти ґрунту.

Ендофітний штам *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1, виділений з насіння рису (*Oryza sativa* L.), синтезував 1020 нг/л ГК₄, 772 нг/л ГК₃, а також неактивні гібереліни (ГК₅, ГК₈, ГК₉, ГК₂₀, ГК₂₄, ГК₃₆) [20].

Бактеріальний ендофіт *Sphingomonas* sp. LK11 завдяки здатності до синтезу індол-3-оцтової кислоти і гіберелінів стимулював ріст томатів (*Tephrosia apollinea*). У культуральній рідині *Sphingomonas* sp. LK11 виявлено фізіологічно активний гіберелін ГК₄ (2970 нг/л), а також неактивні ГК₉ (980 нг/л) і ГК₂₀ (2410 нг/л) [21]. Автори цієї роботи зазначають, що стимуляція росту томатів зумовлена синтезом саме гібереліну ГК₄, що узгоджується з даними, одержаними Ху із співавт. ще у 1998 р. [22].

У табл. 1 наведено дані щодо утворення біологічно активних гіберелінів ГК₄ і ГК₇ симбіотичними, ендофітними та ризосферними бактеріями.

Таблиця 1

Синтез гіберелінів ГК₄ і ГК₇ ризобактеріями

Група бактерій	Штам	Концентрація гібереліну, нг/л		Література
		ГК ₄	ГК ₇	
Симбіотичні азотфіксатори	<i>Rhizobium phaseoli</i>	355	–	[10]
Ризосферні ризобактерії	<i>Bacillus cereus</i> MJ-1	78	56	[14]
	<i>Bacillus macroides</i> CJ-29	76	87	
	<i>Bacillus pumilus</i> CJ-69	42	17	
	<i>Bacillus pumilus</i>	8000–12000	–	[13]
	<i>Bacillus licheniformis</i>			
	<i>Bacillus aryabhattai</i> SRB02	31	12	[15]
	<i>Pseudomonas putida</i> H-2-3	156	–	[16]
	<i>Enterococcus faecium</i> LKE12	40,4	–	[17]
	<i>Serratia nematodiphila</i> PEJ1011	8650	–	[18]
Ендофіти	<i>Sphingomonas</i> sp. LK11	2970	–	[21]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RWL-1	1020	–	[20]

Примітка. «–» – не виявлено.

Ці дані засвідчують, що більшість описаних у літературі ризосферних бактерій здатні до синтезу переважно гібереліну ГК₄, у той час як ГК₇ утворюють лише деякі з них, причому у невисоких концентраціях. Зазначимо, що й рівень синтезу гібереліну ГК₄ у ризосферних бактерій коливається у широких межах (від 30 до 12000 нг/л) (табл. 1). У літературі практично відсутні дані щодо синтезу ГК₄ і ГК₇ бульбичковими бактеріями, що може бути пов'язано з тим, що в утворенні симбіозу беруть участь інші фітогормони (зокрема, ауксини та гібереліни ГК₁ і ГК₃) [2, 7].

Синтез гіберелінів ГК₄ і ГК₇ неасоційованими з рослинами бактеріями. В опублікованому нещодавно огляді [7] зазначалося, що багато мікроорганізмів здатні синтезувати фітогормони, що належать до трьох основних груп гормонів-стимуляторів: ауксини, цитокініни і гібереліни, причому не підтверджується зв'язок фітогормональної активності з патогенністю мікроорганізмів або їх епіфітним (ендофітним) способом існування.

Звичайно ж, здатність до синтезу фітогормонів властива, перш за все, бактеріям, які у процесі розвитку утворюють певні зв'язки з рослинами і використовують для цього фітогормони. Однак навіть серед симбіотичних бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium* концентрація синтезованих екзогенних фітогормонів не завжди корелює з азотфіксувальною активністю. Так, штами, які утворюють бульбочки з практично відсутньою нітрогеназною активністю, можуть синтезувати ауксини у кількостях, що в 10 разів перевищують концентрації, синтезовані високоактивними штамми ризобій [23]. Роль фітогормонів для таких неактивних штамів досі точно не встановлена.

Так само є бактерії, життєдіяльність яких напряму не пов'язана з рослинами, але які здатні синтезувати фітогормони (в тому числі й гібереліни ГК₄ і ГК₇) [24–28].

Штам *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP був обраний серед 864 ізолюваних з ґрунту бактерій, оскільки в умовах дослідження стимулював ріст огірків та ромашки. У фільтраті культуральної рідини цього штаму було виявлено фізіологічно активні гібереліни: ГК₁ – 2,3 нг/л, ГК₃ – 51,1 нг/л і ГК₄ – 26,5 нг/л, а також неактивні ГК₉, ГК₁₂, ГК₁₅, ГК₂₀ і ГК₂₄. На теперішній час це перше і поки що єдине повідомлення про здатність бактерій роду *Burkholderia* синтезувати гібереліни [24].

Бактерії роду *Acinetobacter* є ґрунтовими мікроорганізмами, проте у літературі є лише поодинокі повідомлення про стимуляцію ними росту рослин. Так, у 2009 р. Kang із співавт. [25] встановили, що *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 синтезував 10 різних гіберелінів, у тому числі біологічно активні ГК₁, ГК₃ та ГК₄ (4,5, 62 та 28 нг/л відповідно). Супернатант культуральної рідини стимулював ріст огірків, китайської капусти і ромашки, збільшуючи довжину стебла та вагу рослин порівняно з необробленими рослинами.

У 2012 р. Kang з групою дослідників [26] виділили з ґрунту штам, ідентифікований як *Promicromonospora* sp. SE188, який продукував біоактивні гібереліни ГК₁ (990 нг/л) і ГК₄ (1580 нг/л), а також неактивні ГК₉, ГК₁₂, ГК₁₉, ГК₂₀ та ін. Дослідники інокулювали рослини томатів (*Solanum lycopersicum*) штамом *Promicromonospora* sp. SE188 і спостерігали збільшення довжини стебла та маси рослин.

Штам *Leifsonia soli* sp. SE134 в умовах дослідження стимулював ріст огірків, томатів і молодого редису, сприяючи подовженню стебла, збільшенню маси рослин та вмісту хлорофілу в листі. У культуральній рідині *L. soli* sp. SE134 було ідентифіковано широкий спектр гіберелінів, серед яких були присутні ГК₄ – 15,8 нг/л, ГК₇ – 5,4 нг/л і ГК₁ – 6,1 нг/л [27].

Стимулювати ріст рослин завдяки синтезу гіберелінів можуть і ентомопатогенні бактерії, які використовують для боротьби зі шкідниками. Вперше [28] було проаналізовано ентомопатогенний штам *Photorhabdus temperata* M1021 як потенційний для створення біодобрива. У зв'язку з цим визначали вміст гіберелінів у культуральній рідині штаму. Експерименти показали, що *P. temperata* M1021 продукував достатньо високі концентрації ГК₁ (25000 нг/л) і ГК₃ (8160 нг/л), а також дещо нижчі ГК₄ (1320 нг/л) і ГК₇ (400 нг/л). Крім того, у культуральній рідині виявлено фізіологічно неактивні гібереліни ГК₉, ГК₁₂ та ГК₂₀. Ріст-стимулювальну активність *P. temperata* M1021 перевіряли на гіберелін-дефіцитному

мутанті рису (*Waito-C*), під впливом якого у рослин збільшувалась довжина стебла, вага, а також вміст хлорофілу.

Синтез біологічно активних гіберелінів продуцентами поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. Раніше ми повідомляли [7] про здатність продуцентів поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 синтезувати одночасно з ПАР і фітогормони ауксинової та цитокинінової природи. У подальших дослідженнях було встановлено, що за умов росту на різних вуглецевих субстратах, у тому числі й промислових відходах, штами-продуценти ПАР синтезують біологічно активні гібереліни ГК₃ і ГК₄ (табл. 2). Звертає на себе увагу той факт, що кількість синтезованого *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 гібереліну ГК₄ перевищує у кілька разів концентрацію ГК₃. Тільки за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на відпрацьованій соняшниковій олії кількість утвореного гібереліну ГК₃ була вищою, ніж ГК₄. Крім того, порівняно з іншими бактеріями, навіть і асоційованими з рослинами (табл. 1), *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 синтезують більшу кількість ГК₄.

Ми зазначали [7], що наявні у літературі окремі відомості про одночасний синтез певного цільового продукту і фітогормонів не вписуються у загальноприйняту концепцію «один продуцент – один продукт», якої притримуються більшість дослідників у процесі розробки біотехнологій, акцентуючи увагу тільки на підвищенні синтезу основного продукту. Поодинокі дані літератури і наші власні результати засвідчують перспективність створення багатофункціональних мікробних препаратів з різноманітними біологічними властивостями, до складу яких входить комплекс біологічно активних речовин, у тому числі фітогормонів різної хімічної природи, синтезованих продуцентом в одному технологічному процесі.

Таблиця 2

Синтез гіберелінів ГК₃ і ГК₄ при культивуванні *N. vaccinii* IMB B-7405, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на різних вуглецевих субстратах

Штам	Джерело вуглецю у середовищі культивування	Концентрація, мкг/л	
		ГК ₃	ГК ₄
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Рафінована олія	0,33	5,63
	Відпрацьована олія після смаження картоплі	40,50	6,30
	Відпрацьована олія після смаження м'яса	11,46	6,70
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Етанол	2,40	6,88
	Технічний гліцерин	сліди	7,36
	Рафінована олія	1,00	7,00
	Відпрацьована олія після смаження м'яса	2,16	7,33
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	Етанол	1,83	6,43
	Гексадекан	сліди	5,73
	Рафінована олія	1,60	6,20
	Відпрацьована олія після смаження м'яса	0,17	5,66

Дані щодо синтезу гіберелінів ГК₄ і ГК₇ бактеріями, не задіяними у взаємодії з рослинами, наведено у табл. 3.

Аналіз даних літератури [10–28] показав, що здатність до синтезу гіберелінів ГК₄ і ГК₇ виявлена як у асоційованих з рослинами мікроорганізмів, так і у тих, які не беруть участі у такій взаємодії. Проте більшість з них синтезують лише гіберелін ГК₄, який є попередником біосинтезу ГК₇. Зазначимо, що у літературі відомостей щодо синтезу бактеріями гіберелінів ГК₄ і ГК₇ значно менше, ніж щодо синтезу інших фітогормонів (наприклад, ауксинів та цитокінінів). Крім того, рівень синтезу гіберелінів ГК₄ і ГК₇ у бактерій не дає змоги розглядати їх як потенційні продуценти цих біологічно активних речовин.

Таблиця 3

Утворення гіберелінів ГК₄ і ГК₇ неасоційованими з рослинами бактеріями

Штам	Концентрація гібереліну, нг/л		Література
	ГК ₄	ГК ₇	
<i>Burkholderia</i> sp. KCTC 11096BP	26,5	–	[24]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> SE370	28	–	[25]
<i>Promicromonospora</i> sp. SE188	1580	–	[26]
<i>Leifsonia soli</i> sp. SE134	15,8	5,4	[27]
<i>Photorhabdus temperata</i> M1021	1320	400	[28]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	6,88–7,36 мкг/л	–	Наші дослідження
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017	5,66–6,43 мкг/л	–	Наші дослідження
<i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	5,63–6,7 мкг/л	–	Наші дослідження

Примітка. «–» – не виявлено

Утворення гіберелінів ГК₄ і ГК₇ ендofітними грибами. Представниками мікробіоти ґрунту є мікроскопічні гриби, які синтезують біологічно активні сполуки, перспективні для використання у сільському господарстві, медицині та харчовій промисловості [3, 29–33]. Гриби утворюють гіберелін ГК₃ у відносно високих концентраціях [4], а оскільки гібереліни ГК₄ та ГК₇ є попередниками біосинтезу ГК₃, можна сподіватися, що й рівень синтезу ГК₄ та ГК₇ у грибів буде вищим, ніж у бактерій.

Ендofітні гриби є відомими рослинними симбіонтами. Їх також називають PGPEF грибами (від plant growth-promoting endophytic fungi – гриби-ендофіти, що стимулюють ріст рослин). До 2009 р. у літературі було дуже мало даних щодо синтезу грибами-ендофітами ріст-стимулювальних фітогормонів, особливо гіберелінів.

Одне з перших повідомлень про здатність ендofітних грибів утворювати гібереліни датується 2005 р. [30]. З коренів чотирьох видів кунжуту (*Sesamum indicum*) було ізольовано 54 ендofіти, серед яких 11 виявилися грибами, а найвищі показники синтезу продемонстрував штам *Penicillium commune* KNU5379, який утворював всі фізіологічно активні гібереліни, серед яких кількісно переважали ГК₄ (24,48 мкг/л) і ГК₇ (10,36 мкг/л). Ріст-стимулювальну активність штаму перевіряли на гіберелін-дефіцитному мутанті рису (*Waito-C*): обробка культуральною рідиною *P. commune* KNU5379 забезпечувала більший приріст довжини пагона, ніж контроль,

що свідчить про позитивний вплив екзометаболітів гібереллової природи.

У 2008–2009 рр. Khan зі співавт. було опубліковано кілька робіт, у яких вони досліджували ендоефітні гриби флори піщаних дюн з метою пошуку потенційних продуцентів гіберелінів. З коріння рослин *Ixeris repenes* (типовий представник флори піщаних дюн) було ізольовано 15 грибів-ендоефітів [31]. Ізолят IR-3-3 забезпечував найбільший приріст рослин рису *Waito-C* та насіння лободи (*Atriplex gmelinii*). Аналіз культуральної рідини штаму IR-3-3 показав, що у ній наявні фізіологічно активні гібереліни ГК₄ (6,03 мкг/л), ГК₇ (2,35 мкг/л), ГК₃ (3,83 мкг/л), ГК₁ (1,95 мкг/л), а також ряд неактивних. Ізолят було ідентифіковано як *Penicillium citrinum* КАСС43900. Цікаво, що ріст-стимулювальна активність та гіберелін-синтезувальна здатність цього штаму виявилися вищими, ніж в дикого типу *Gibberella fujikuroi*, використаного як контроль [31].

З коренів іншої розповсюдженої у піщаних дюнах рослини – осоки Кобомуги (*Carex kobomugi* Ohwi) – було виділено новий штам *Arthrinium phaeospermum* КАСС43901 [32]. У культуральній рідині штаму виявили гібереліни ГК₄ (4,7 мкг/л), ГК₇ (2,2 мкг/л), ГК₃ (8,8 мкг/л), незначну кількість ГК₁ (0,5 мкг/л), а також гібереліни ГК₅, ГК₉, ГК₁₂, ГК₁₅ та ГК₂₄. Крім того, дослідники виділяли ендоефіти з колосняку (*Elymus mollis*) [33]. Серед восьми ізолятів найактивнішим виявився штам ЕМ-7-1, який утворював ГК₄ (0,82 мкг/л), ГК₇ (0,1 мкг/л), а також ГК₃ (5,76 мкг/л) і ГК₁ (0,32 мкг/л) разом з неактивними гіберелінами ГК₅, ГК₉, ГК₂₀ та ГК₂₄. Ізолят ідентифікували як *Gliomastix murorum* КАСС43902.

Крім того, у 2009 р. було опубліковано роботу, в якій описано дванадцять ізолятів, виділених з коріння сої, серед яких десять стимулювали ріст рослин, а два навпаки – інгібували [29]. Спектр гіберелінів, синтезованих найактивнішим штамом ДК-1-1, включав лише три з чотирьох фізіологічно активних гіберелінів – ГК₄ (2,1 мкг/л), ГК₇ (1,26 мкг/л), ГК₃ (6,62 мкг/л) і ряд неактивних – ГК₅, ГК₁₅, ГК₁₉ та ГК₂₄. Ізолят було ідентифіковано як новий штам *Cladosporium sphaerospermum* IJL07.

У 2010 р. група дослідників на чолі з Намаюн опублікували роботи [34–36], у яких описані PGPEF є перспективними для використання у рослинництві завдяки здатності до синтезу гіберелінів. Серед досліджуваних ендоефітів було ідентифіковано кілька штамів, які проявляли найбільшу активність: *Cladosporium* sp. МН-6, *Penicillium* sp. М5.А, *Aspergillus* sp. М1.5 та *Penicillium* sp. МН7. Всі штами в умовах досліду значно збільшували довжину стебла гіберелін-дефіцитного штаму рису (*Waito-C*) порівняно з диким типом *F. fujikuroi*, використаним як контроль. Як *Penicillium* sp. М5.А, так і *Aspergillus* sp. М1.5 синтезували ГК₇ (6,68 та 6,29 мкг/л відповідно) і ГК₄ (2,6 та 1,37 мкг/л відповідно), але в той же час не синтезували ГК₁. *Penicillium* sp. МН7 утворював більше ГК₄ (8,62 мкг/л) і менше ГК₇ (2,05 мкг/л), а також ГК₁ і ГК₃. Найбільшу концентрацію ГК₄ (13,35 мкг/л) синтезував *Cladosporium* sp. МН-6.

У 2013 р. You зі співавт. [37] повідомили про виділення з коренів плетухи монетницевої (*Calystegia soldanella*) 14 грибів-ендоефітів, з яких ріст-стимулювальна активність була встановлена лише для ізоляту Cs-8-1. У культуральній рідині цього штаму, ідентифікованого як *Cadophora talorum*, було виявлено гібереліни ГК₄ (3,6 мкг/л) і ГК₇ (1,3 мкг/л), а також ГК₁, ГК₃, ГК₉, ГК₁₂, ГК₂₀ та ін.

Скринінг ендоефітів, ізолюваних з кори дерева *Moringa peregrina*, дав змогу виявити штами *Aspergillus caespitosus* LK12 та *Phoma* sp. LK13 [38], які продукували 26,5 і 23,7 мкг/л ГК₄ відповідно, а також 2,87 і 22,7 мкг/л ГК₇.

Виявлено [39] здатність ендоефітного і сапротрофного штамів *Penicillium funiculosum* синтезувати біологічно активні гібереліни ГК₃, ГК₄ та слідові кількості ГК₇. Проте зазначимо, що рівень синтезу гібереліну ГК₄ (4,9 нг/г біомаси) ендоефітним штамом є значно нижчим, ніж відомих з літератури грибів-ендоефітів, у тому числі й представників роду *Penicillium* [30–33, 40, 41].

У 2018 р. [42] з коріння кислоти рожевої (*Oxalis corniculata*) було виділено два штами ендоефітів *Aspergillus fumigatus* TS1 та *Fusarium proliferatum* BRL1. Ізоляти перевіряли на такі ріст-стимулювальні властивості: активність сідерофорів, солюбілізація фосфатів, утворення гіберелінів та індоліл-3-оцтової кислоти. Аналіз показав, що TS1 і BRL1 здатні до синтезу ГК₇ (0,02 і 0,49 мкг/л), ГК₁ (0,09 і 0,39 мкг/л) та ГК₃ (0,32 і 0,09 мкг/л) відповідно.

Ендоефіт *Preussia* sp. BSL-10, виділений з коріння рослин босвелії священної (*Boswellia sacra*), утворював ГК₄ (0,27 мкг/л), ГК₇ (0,4 мкг/л), ГК₁₅ та ГК₅₃ [43].

Синтез ГК₄ і ГК₇ ендоефітними грибами в умовах стресу. З літератури [40, 41, 44] відомо, що ендоефіти допомагають рослинам-живителям виживати за дії високих температур, сольових стресів, хвороб та посухи. Тому пошук ендоефітів доцільно проводити в стресових умовах, які можуть стимулювати утворення взаємозв'язків грибів з тканинами кореня.

З коріння рослин сої, що перебували в умовах посухи (обробка 16%-м розчином поліетиленгліколю упродовж двох тижнів), було ізолювано 10 ендоефітів і проаналізовано їх ріст-стимулювальні властивості на рослинах рису і проростках сої [45]. Найактивніший ізолят ідентифікували як *Chrysosporium pseudomerdatarium* IJL01. Встановлено, що цей штам синтезує усі фізіологічно активні гібереліни – ГК₄ (2,58 мкг/л), ГК₇ (1,39 мкг/л), ГК₃ (8,99 мкг/л) і ГК₁ (0,24 мкг/л), а також деякі неактивні.

Пізніше було виділено вісім ендоефітів з коріння перцю (*Capsicum annuum* L.), вирощеного у піщаному ґрунті [46]. Культуральну рідину ідентифікованого штаму *Chaetomium globosum* LK4 проаналізували на вміст гіберелінів і виявили присутність ГК₄ (21,8 мкг/л) і ГК₁ (0,67 мкг/л), а також деяких фізіологічно неактивних гіберелінів.

Є повідомлення [44, 47] про виділення ендоефітів з сої, яку попередньо піддавали дії сольового стресу (100 мМ NaCl). Серед двох виділених та ідентифікованих штамів більш активним продуцентом ГК₄ і ГК₇ виявився *Scolecobasidium tshawytschae* IJL03, який синтезував 18,58 мкг/л ГК₄ і 8,95 мкг/л ГК₇. Інший штам *Phoma herbarum* утворював гібереліни у значно нижчих концентраціях (1,4–3,2 мкг/л). Крім того, обидва штами також синтезували і гібереліни ГК₁ і ГК₃.

Узагальнені дані про синтез грибами-ендоефітами ГК₄ і ГК₇ наведено у табл. 4.

Отже, здатність до синтезу гіберелінів виявлена у широкого спектру грибів, виділених з різноманітних рослин, які ростуть у різних кліматичних зонах. Рівень синтезу ГК₄ і ГК₇ не перевищував 25 мкг/л, проте він є

вищим, ніж у бактерій (табл. 1–3). Зазначимо, що в деяких дослідженнях ендоефіти, виділені з рослин, попередньо підданих сольовому або абіотичному стресу, синтезували більше біологічно активних гіберелінів ГК₄ і ГК₇.

Продуктивність рослин в стресових умовах за обробки гіберелін-синтезувальними ендоефітами. Синтез гіберелінів ендоефітними грибами є одним з механізмів, які дають змогу рослинам виживати в стресових умовах, а також забезпечують збільшення підземної та наземної біомаси [31, 48–50]. У 2011–2012 рр. Хан із співавт. було проведено ряд досліджень щодо впливу ендоефітних грибів на ріст і розвиток рослин в стресових умовах (абіотичний, сольовий стрес) [51–54]. Так, було ізольовано [51] 13 штамів грибів з коріння рослин сої, ріст-стимулювальні властивості яких в подальшому перевіряли на гіберелін-дефіцитному мутанті рису (*Waito-C*). Найактивніший штам GMH-1a ідентифікували як *Aspergillus fumigatus* sp. LH02. Хроматографічний аналіз культуральної рідини штаму показав наявність ГК₄ (24,8 мкг/л), ГК₉ (1,2 мкг/л) та ГК₂₀ (9,8 мкг/л). У рослин сої, інокульованих цим штамом, значно збільшилася довжина стебла та його маса, площа поверхні листя, вміст хлорофілу та швидкість

Таблиця 4

Утворення гіберелінів ГК₄ і ГК₇ ендоефітними грибами

Рослина	Ендоефіт	Гібереліни, мкг/л		Література
		ГК ₄	ГК ₇	
<i>Sesatum indicum</i> (кунжут)	<i>Penicillium commune</i> KNU5379	24,48	10,36	[30]
<i>Ixeris repenes</i>	<i>Penicillium citrinum</i> KACC43900	6,03	2,35	[31]
<i>Carex kobomugi</i> Ohwi (осока)	<i>Arthrimum phaeospermum</i> KACC43901	4,7	2,2	[32]
<i>Elymus mollis</i> (колосняк)	<i>Gliomastix murorum</i> KACC43902	0,82	0,1	[33]
<i>Glycine max</i> L. (соя)	<i>Chrysosporium pseudomerdarium</i>	2,58	1,39	[45]
	<i>Scolecobasidium tshawytschae</i> IJL03	18,58	8,95	[47]
	<i>Phoma herbarum</i>	0,11	2,91	[44]
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> IJL07	2,1	1,26	[29]
<i>Cucumis sativus</i> L. (огірок звичайний)	<i>Cladosporium</i> sp. MH-6	13,35	2,4	[34]
<i>Monochoria vaginalis</i> (бур'ян)	<i>Penicillium</i> sp. M5.A	2,6	6,68	[35]
	<i>Aspergillus</i> sp. M1.5	1,37	6,29	
<i>Chrysanthemum coronarium</i> (ромашка)	<i>Penicillium</i> sp. MH7	8,62	2,05	[36]
<i>Capsicum annuum</i> L. (перець)	<i>Chaetomium globosum</i> LK4	21,8	0,67	[46]
<i>Calystegia soldanella</i> (плетуха монетницева)	<i>Cadophora malorum</i>	3,6	1,3	[37]
<i>Moringa peregrina</i>	<i>Aspergillus caespitosus</i> LK12	26,5	2,87	[38]
	<i>Phoma</i> sp. LK13	23,7	22,7	
<i>Oxalis corniculata</i> (кислиця рожкова)	<i>Aspergillus fumigatus</i> TS1	–	0,02	[42]
	<i>Fusarium proliferatum</i> BRL1	–	0,49	
<i>Boswellia sacra</i> (босвелія священна)	<i>Preussia</i> sp. BSL-10	0,27	0,4	[43]

Примітка. «–» – не виявлено.

фотосинтезу при сольовому стресі (70 і 140 мМ NaCl) порівняно з неінокульованими рослинами.

Пізніше [52] було виділено 10 ізолятів з коріння рослин сої, серед яких ідентифікували штам *Penicillium minioluteum* LHL09, котрий показав найбільшу стимуляцію росту рису *Waito-C*. У культуральній рідині штаму було виявлено гібереліни ГК₄ (12,84 мкг/л) та ГК₇ (48,91 мкг/л). Автори зазначають, що екзогенні гібереліни ендofіта впливають на утворення рослинних фітогормонів (абсцизової та саліцилової кислот), що допомагає їм рости в умовах сольового стресу (70 і 140 мМ NaCl). Обробка насіння сої *P. minioluteum* LHL09 позитивно впливала на довжину та вагу стебла, вміст хлорофілу у листі та їх площу.

Крім того, автори досліджували ріст рослин в умовах абіотичного стресу [53]. З рослин огірків (*Cucumis sativus* L.) ізолювали новий ендofіт *Exophiala* sp. LHL08 та перевірили його ріст-стимулювальні властивості на гіберелін-дефіцитному сорті рису *Waito-C* та звичайному сорті рису *Dongjin-beyo*. Обробка насіння штамом LHL08 забезпечувала активніший ріст і виживання в умовах стресу, спричиненого дефіцитом води (обробка 12%-м розчином поліентиленгліколю упродовж 7 днів) та осмотичним шоком (60 і 120 мМ NaCl). Аналіз культуральної рідини штаму LHL08 показав наявність у ній восьми різних гіберелових кислот, серед яких були біологічно активні ГК₄ (121,5 мкг/л), ГК₇ (133,47 мкг/л), ГК₁ (3,55 мкг/л), ГК₃ (3,98 мкг/л), а також неактивні ГК₅, ГК₉, ГК₁₂ та ГК₂₀. Одержані результати дозволяють припустити, що попередня обробка сої ендofітними грибами *Exophiala* sp. LHL08 сприятиме стимуляції росту соєвих рослин в умовах сольового стресу.

З рослин огірків було виділено ще один штам – *Paecilomyces formosus* LHL10 [54], який перевіряли в умовах, описаних у роботі [53]. Штам LHL10 синтезував ГК₄ (18,2 мкг/л), ГК₁ (1,3 мкг/л), ГК₃ (1,1 мкг/л), а також ряд неактивних гіберелінів. Інокуляція *P. formosus* LHL10 рослин огірків запобігала пошкодженню рослин від сольового стресу.

Було проаналізовано [55] два штами, виділені з рослин огірків – *Phoma glomerata* LWL2 та *Penicillium* sp. LWL3. Встановлено, що штам LWL2 утворював всі активні гібереліни: ГК₄ (0,22 мкг/л), ГК₇ (4,2 мкг/л), ГК₁ (8,72 мкг/л) і ГК₃ (2,42 мкг/л), у той час як штам LWL3 синтезував лише ГК₁ (5,33 мкг/л) та ГК₃ (3,42 мкг/л). Інокуляція насіння огірків штамами грибів значно збільшувала біомасу рослин та показники росту в умовах солоності, а також в умовах посухи порівняно з контрольними рослинами.

Встановлено, що ендofіт сої, ідентифікований як *Penicillium funiculosum* LHL06 [56], синтезував біологічно активні гібереліни ГК₁ (1,53 мкг/л), ГК₄ (9,34 мкг/л), фізіологічно неактивні ГК₈ і ГК₉, а також індоліл-оцтову кислоту (14,85 мкг/л). Обробка насіння сої штамом LHL06 супроводжувалася підвищенням стійкості (порівняно з неінокульованими рослинами) при сольовому стресі (70 і 140 мМ NaCl) [56] і за наявності 100 мкмоль/л катіонів міді [57].

У 2012 р. опубліковано роботу [58], в якій чотири ендofіти (GM-1, GM-2, GM-3 та GM-4) перевіряли на їх здатність стимулювати ріст сої в умовах сольового стресу (обробка 100 мМ NaCl). Результати показали, що проростання насіння і швидкість росту були вищими у разі попередньої його обробки ендofітами. У культуральній рідині штамів GM-1, GM-2 і

GM-4 виявлено фізіологічно активні ГК₄ і ГК₇. Найбільшу кількість гіберелінів синтезував штам GM-1 (0,29 мкг/л ГК₄ і 0,2 мкг/л ГК₇).

В умовах сольового стресу GM-1 значно збільшував довжину та вагу рослин сої порівняно з рослинами, обробленими іншими грибами. Рослини сої, які обробляли ендofітними грибами, краще росли в умовах сольового стресу, ніж необроблені [58]. У той же час оскільки в культуральній рідині ізоляту GM-3 не було виявлено фізіологічно активних гіберелінів, немає прямої кореляції між гіберелін-синтезувальною здатністю і посиленням стресостійкості рослин. Однак враховуючи те, що під дією GM-1, який синтезував найбільшу кількість гіберелінів, рослини сої демонстрували найвищу продуктивність, можна зробити висновок, що гібереліни відіграють значну роль у пом'якшенні дії сольового стресу. Ізолят GM-1 пізніше було ідентифіковано як *Fusarium verticillioides* RK01 (телеоморфа *Gibberella moniliformis*).

У табл. 5 наведено узагальнені дані про синтез гіберелінів ГК₄ і ГК₇ ендofітними грибами, які підвищують продуктивність рослин в стресових умовах.

Таблиця 5

Утворення ендofітами гіберелінів ГК₄ і ГК₇, які беруть участь в підвищенні стресостійкості рослин

Рослина	Ендofіт	Концентрація гібереліну, мкг/л		Література
		ГК ₄	ГК ₇	
<i>Glycine max</i> L. (соя)	<i>Aspergillus fumigatus</i> sp. LH02	24,8	–	[51]
	<i>Penicillium minioluteum</i> LHL09	12,84	48,91	[52]
	<i>Penicillium funiculosum</i> LHL06	9,34	–	[56]
	<i>Fusarium verticillioides</i> RK01	0,29	0,2	[58]
<i>Cucumis sativus</i> L. (огірок звичайний)	<i>Exophiala</i> sp. LHL08	121,5	133,47	[53]
	<i>Paecilomyces formosus</i> LHL10	18,2	–	[54]
	<i>Phoma glomerata</i> LWL2	0,22	4,2	[55]

Примітка. «–» – не виявлено.

Інтенсифікація синтезу ГК₄ і ГК₇. Незважаючи на те, що перші дослідження щодо підвищення синтезу цих гіберелінів розпочалися у середині 90-х років ХХ ст. [6, 59], до теперішнього часу у літературі є небагато відомостей про одержання активних продуцентів ГК₄ і ГК₇.

При перевірці 25 колекційних штамів *F. moniliforme* на здатність до синтезу ГК₄ і ГК₇ було відібрано 4 штами, які переважно утворювали ці біологічно активні гібереліни [6]. Штам 73.10б на середовищі Ролен–Тома утворював 60,5 мг/л ГК₄, а штам F8.10 на середовищі з соняшниковою олією і кукурудзяним екстрактом – 88 мг/л ГК₇. Для підвищення синтезувальної здатності цих штамів здійснювали злиття і регенерацію протопластів, у результаті чого одержали штам G5-7, який синтезував до 200 мг/л ГК₇ і штам G5-4, який утворював 100 мг/л ГК₄ і 28 мг/л ГК₇.

У подальших експериментах встановлювали умови культивування штаму G5-4, які б дали змогу регулювати співвідношення ГК₄ і ГК₇ у культуральній рідині. У процесі культивування цього штаму на середовищі з сахарозою і нітратом натрію при початковому значенні рН 4,5

концентрація ГК₄ становила 89,3 мг/л і не відбувалося утворення ГК₇. Освітлення (2000 лк) упродовж процесу дало змогу збільшити кількість ГК₄ до 145 мг/л, що становило 97 % від вмісту гіберелінів [6].

Зміна температурного режиму під час культивування штаму G5-7 у ферментері на середовищі з соняшниковою олією і кукурудзяним екстрактом (25 °С упродовж перших 5 діб і 28 °С – наступних 4–5 діб) супроводжувалася синтезом 300 мг/л ГК₇ [6].

У 1997 р. було створено штам *F. moniliforme* ВКПМ F-446 – надпродуцент гібереліну ГК₇, який утворює гібереліни ГК₃ і ГК₄ в незначних кількостях [59]. Штам-надсинтетик було одержано шляхом злиття протопластів штаму, виділеного з ураженого рису з наступною їх обробкою УФ-опроміненням. Штам синтезував 400–700 мг/л гібереліну ГК₇ і всього 20–80 мг/л ГК₄ на середовищі з соняшниковою олією (60 г/л), кукурудзяним екстрактом (35 г/л) і ацетатом амонію (0,57 г/л).

В інших дослідженнях [5] штам *Gibberella fujikuroi* 1019 піддавали комбінованому мутагенезу з використанням правастатину (250 мг/л), що інгібує активність гідроксиметилплутарил-КоА-редуктази – фермента, який бере участь в утворенні мевалонової кислоти (інтермедиату біосинтезу гіберелінів), і УФ-опромінення. В результаті було одержано мутант Mor-189, здатний до синтезу гібереліну ГК₃ і гібереліну ГК₄. Мутант Mor-189 синтезував переважно ГК₄ при підтриманні рН на рівні 5,5 упродовж культивування з використанням глюкози і пшеничного глютену як джерел вуглецю і азоту відповідно. Підвищення синтезу гібереліну ГК₄ спостерігали у разі підживлення глюкозою у процесі культивування штаму Mor-189. За таких умов концентрація гібереліну ГК₄ досягала 600 мг/л, що становило 84 % від загальної кількості ГК₄ і ГК₃ (713 мг/л).

У 2003 р. [60] штам *G. fujikuroi* m567 обробляли УФ-променями, в результаті чого було одержано мутант 6314, який ніс мутацію у гені *P450-3*, відповідальному за перетворення ГК₇ у ГК₃, а також ГК₄ у ГК₁. Одержаний мутант 6314 втратив здатність синтезувати ГК₃ і утворював 414 мг/л ГК₇ (у 6,7 разів більше за дикий тип) та 34 мг/л ГК₄ (у 1,5 рази більше порівняно з вихідним штамом) на середовищі з глюкозою (80 г) та нітратом амонію (0,48 г). На наступному етапі досліджень з метою одержання мутанта, здатного синтезувати лише ГК₄, шляхом трансформації протопластів плазмідним вектором було вимкнено ген *DES*, який кодує десатуразу. В результаті було одержано мутант 6314/ Δ *DES*, який продукував до 380 мг/л ГК₄ і взагалі не утворював ГК₇.

У 2013 р. році та ж група дослідників [61] спробувала інтенсифікувати синтез гіберелінів видаленням гену *PPT1*, що кодує 4'-фосфопантетеїніл трансферазу, щоб забезпечити весь потік ацетил-КоА на біосинтез ізотерпеноїдів, а отже, й гіберелінів. У результаті досліджень вдалося одержати мутант 6314/ Δ *DES*/ Δ *PPT1*, який синтезував на середовищі з глюкозою та сульфатом амонію лише ГК₄ у концентрації 500 мг/л.

Таким чином, ГК₄- і ГК₇-синтезувальна здатність одержаних мутантних та генно-інженерних штамів *Fusarium moniliforme* та *Gibberella fujikuroi* є на порядки вищою, ніж у вихідних штамів, проте залишається недостатньо високою порівняно з показниками синтезу гібереліну ГК₃.

Отже, аналіз даних літератури показав, що здатність до синтезу біологічно активних гіберелінів ГК₄ і ГК₇ (іноді й за відсутності ГК₃), при-
тамання широкому спектру бактерій і грибів, причому ці фітогормони
утворюють і неасоційовані з рослинами бактерії. Гриби-ендофіти синте-
зують на порядки вищі концентрації гіберелінів, ніж бактерії.

У доступній літературі нам вдалося знайти кілька робіт, в яких повідо-
мляється про спроби дослідників підвищити мікробний синтез гіберелі-
нів ГК₄ і ГК₇. На теперішній час вдалося збільшити концентрацію цих
гіберелінів до 500–700 мг/л, що на порядки вище порівняно з вихідними
штамами. Зазначимо, що й у перших технологіях мікробного синтезу гібе-
реліну ГК₃ його концентрація також не перевищувала 0,3–0,5 г/л [3, 7], що
не стало перешкодою для організації промислового виробництва цього
фітогормону в 50-х роках ХХ ст. Враховуючи арсенал сучасних методів
метаболическої та генетичної інженерії, що є у розпорядженні дослідників,
а також можливості системної біології, можна сподіватися, що одержання
штамів-надсинтетиків гіберелінів ГК₄ і ГК₇ буде реалізоване в найближ-
чому майбутньому, про що засвідчують публікації останніх років щодо
інтенсифікації біосинтезу ГК₃ [3, 4, 62–64], а також регуляції біосинтезу
гіберелінів [65].

СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ГИББЕРЕЛЛИНОВ ГК₄ И ГК₇ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Т.П. Пирог^{1,2}, Д.В. Гаврилкина¹, Н.О. Леонова²,
Т.А. Шевчук², Г.А. Иутинская²

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Резюме

Среди большого разнообразия (свыше 130) гиббереллинов (ГК) биологической
активностью обладают ГК₁, ГК₃, ГК₄ и ГК₇, однако микробному синтезу двух по-
следних в литературе уделяется значительно меньше внимания, чем ГК₃. Одной из
причин этого является невысокая концентрация синтезированных микроорганизма-
ми гиббереллинов ГК₄ и ГК₇ (на порядки ниже, чем ГК₃, микробный синтез кото-
рого реализован в промышленном масштабе). Вместе с тем высокая биологическая
активность ГК₄ и ГК₇ (в некоторых случаях выше, чем ГК₃) обусловила в последние
годы повышение интереса исследователей к этим гиббереллинам. В обзоре сумми-
рованы данные литературы об образовании ГК₄ и ГК₇ как ассоциированными с рас-
тениями бактериями и грибами, так и не находящимися в таком взаимодействии
микроорганизмами, а также о повышении синтеза этих гиббереллинов мутантными
и генно-инженерными штаммами *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). Не-
многочисленные на сегодняшний день сообщения об интенсификации микробного
синтеза гиббереллинов ГК₄ и ГК₇ (увеличение концентрации до 500–700 мг/л, что на
порядки выше по сравнению с исходными штаммами) свидетельствуют о потенци-
альной возможности реализации технологий получения этих биологически активных
гиббереллинов в промышленном масштабе.

Ключевые слова: фитогормоны, микробный синтез, гиббереллины ГК₄ и ГК₇.

SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE GIBBERELLINS GA₄ AND GA₇ BY MICROORGANISMS

**T.P. Pirog^{1,2}, D.V. Havrylkina¹, N.O. Leonova²,
T.A. Shevchuk², G.O. Iutynska²**

¹National University of Food Technologies,
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

Among the great variety (over 130) of gibberellins (GA), biological activity is possessed by GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇, but in literature much less attention is paid to the microbial synthesis of the last two as compared with GA₃. One of the reasons for this is a low concentration of GA₄ and GA₇ gibberellins synthesized by microorganisms (on orders of magnitude lower than GA₃, whose microbial synthesis is realized on industrial scale). At the same time, the high biological activity of GA₄ and GA₇ (in some cases higher than GA₃) has led in recent years to increase the interest of researchers in these gibberellins. The review summarizes the literature data on the formation of GA₄ and GA₇ as plant-associated bacteria and fungi and microorganisms that are not in this interaction, also on the synthesis of these gibberellins by mutant and genetically engineered strains of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). The few reports for now on the intensification of microbial synthesis of gibberellins GA₄ and GA₇ (increasing the concentration to 500–700 mg/l, which is on orders of magnitude higher than the original strains) indicate the potential for the realization of technologies for the production of these biologically active gibberellins on industrial scale.

Key words: phytohormones, microbial synthesis, gibberellins GA₄ and GA₇.

1. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. 3 Biotech. 2017; 7(1):15. doi: 10.1007/s13205-016-0586-4.
2. The Gibberellins. In: Annual plant reviews (Volume 49) / Ed. Hedden P, Thomas GS. Wiley Blackwell; 2016. 472 p.
3. Shi TQ, Peng H, Zeng SY, Ji RY, Shi K, Huang H et al. Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. Bioengineered. 2017; 8(2):124–8. doi: 10.1080/21655979.2016.1212138.
4. Rangaswamy V. Improved production of gibberellic acid by *Fusarium moniliforme*. J Microbiol Res. 2012; 2(3):51–5. doi: 10.5923/j.microbiology.20120203.02.
5. Lale G, Gadre R. Enhanced production of gibberellin A₄ (GA₄) by a mutant of *Gibberella fujikuroi* in wheat gluten medium. Ind Microbiol Biotechnol. 2010; 37(3):297–306.
6. Makeeva A. [Research of microbial synthesis individual gibberellins and abscisic acid]. Thesis for the degree of candidate of biological sciences by speciality 03.00.23 – biotechnology. Moscow; 1996. Russian.
7. Pirog TP, Iutynska GO, Leonova NO, Beregova KA, Shevchuk TA. Microbial synthesis of phytohormones. Biotechnologia Acta. 2018; 11(1):5–24. <https://doi.org/10.15407/biotech11.01.005>.
8. Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CL, Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech. 2015; 5(4):355–77. doi: 10.1007/s13205-014-0241-x.

9. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. *Molecules*. 2016; 21(5):E573. doi: 10.3390/molecules21050573.
10. Atzorn R, Crozier A, Wheeler CT, Sandberg G. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*. 1988; 175(4):532–8. doi: 10.1007/BF00393076.
11. Méndez C, Baginsky C, Hedden P, Gong F, Carú M, Rojas MC. Gibberellin oxidase activities in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Phytochemistry*. 2014; 98:101–9. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.11.013.
12. Nett RS, Contreras T, Peters RJ. Characterization of CYP115 as a gibberellin 3-oxidase indicates that certain rhizobia can produce bioactive gibberellin A₄. *ACS Chem Biol*. 2017; 12(4):912–917. doi: 10.1021/acscchembio.6b01038.
13. Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Mehrouachi J, Tadeo FR, Talon M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plantarum*. 2001; 111(2):206–11. doi: 10.1034/j.1399–3054.2001.1110211
14. Joo GJ, Kim YM, Lee IJ, Song KS, Rhee IK. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnol Lett*. 2004; 26(6):487–91. doi: 10.1023/B:BILE.0000019555.87121.34
15. Park YG, Mun BG, Kang SM, Hussain A, Shahzad R, Seo CW et al. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PloS one*. 2017; 12(3):e0173203. doi: 10.1371/journal.pone.0173203.
16. Kang SM, Radhakrishnan R, Khan AL, Kim MJ, Park JM, Kim BR et al. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol Biochem*. 2014; 84:115–24. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.09.001.
17. Lee KE, Radhakrishnan R, Kang SM, You YH, Joo GJ, Lee IJ et al. *Enterococcus faecium* LKE12 cell-free extract accelerates host plant growth via gibberellin and indole-3-acetic acid secretion. *J Microbiol Biotechnol*. 2015; 25(9):1467–75. doi: 10.4014/jmb.1502.02011.
18. Kang SM, Khan AL, Waqas M, You YH, Hamayun M, Joo GJ et al. Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low temperature stress in *Capsicum annuum* L. *Eur J Soil Biol*. 2015; 68:85–93.
19. Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. *Mycological research*. 2005; 109(6):661–86. doi: 10.1016/j.ejsobi.2015.02.005.
20. Shahzad R, Waqas M, Khan AL, Asaf S, Khan MA, Kang SM et al. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiol. Biochem*. 2016; 106:236–43. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.006.
21. Khan AL, Waqas M, Kang SM, Al-Harrasi A, Hussain J, Al-Rawahi A et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *J Microbiol*. 2014; 52(8):689–95. doi: 10.1007/s12275–014–4002–7.
22. Xu X, van Lammeren AA, Vermeer E, Vreugdenhil D. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiol*. 1998; 117(2):575–84.

23. Leonova NO, Dankevich LA, Dragovoz I.V. [Synthesis of extracellular phytohormones-stimulants with nodule and phytopathogenic soybean bacteria]. The report of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2013; 3:165–71. Ukrainian.
24. Joo GJ, Kang SM, Hamayun M, Kim SK, Na CI, Shin DH et al. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. J Microbiol. 2009; 47(2):167–71. doi: 10.1007/s12275-008-0273-1.
25. Kang SM, Joo GJ, Hamayun M, Na CI, Shin DH, Kim HY et al. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. Biotechnol. Lett. 2009; 31(2):277–81. doi: 10.1007/s10529-008-9867-2.
26. Kang SM, Khan AL, Hamayun M, Hussain J, Joo GJ, You YH et al. Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones. J Microbiol. 2012; 50(6):902–9. doi: 10.1007/s12275-012-2273-4.
27. Kang SM, Khan AL, You YH, Kim JG, Kamran M, Lee IJ. Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. J Microbiol Biotechnol. 2014; 24(1):106–12. doi: 10.4014/jmb.1304.04015.
28. Ullah I, Khan AR, Jung BK, Khan AL, Lee IJ, Shin JH. Gibberellins synthesized by the entomopathogenic bacterium, *Photobacterium temperata* M1021 as one of the factors of rice plant growth promotion. J Plant Interact. 2014; 9(1):775–82. doi: 10.1080/17429145.2014.942956.
29. Hamayun M, Khan SA, Ahmad N, Tang DS, Kang SM, Na CI et al. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. World J Microbiol Biotechnol. 2009; 25(4):627–32. doi: 10.1007/s11274-009-9982-9.
30. Choi WY, Rim SO, Lee JH, Lee JM, Lee IJ, Cho KJ et al. Isolation of gibberellins-producing fungi from the root of several *Sesamum indicum* plants. J Microbiol Biotechnol. 2005; 15(1):22–8.
31. Khan SA, Hamayun M, Yoon H, Kim HY, Suh SJ, Hwang SK et al. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. BMC Microbiol. 2008; 8(1):231. doi: 10.1186/1471-2180-8-231.
32. Khan SA, Hamayun M, Kim HY, Yoon HJ, Seo JC, Choo YS et al. A new strain of *Arthrrium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. Biotechnol. Lett. 2009; 31(2):283–7. doi: 10.1007/s10529-008-9862-7.
33. Khan SA, Hamayun M, Kim HY, Yoon HJ, Lee IJ, Kim JG. Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. World J Microbiol Biotechnol. 2009; 25(5):829–33. doi: 10.1007/s11274-009-9981-x.
34. Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Rehman G, Kim YH, Iqbal I et al. Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). Mycologia. 2010; 102(5):989–95. doi: 10.3852/09-261.
35. Ahmad N, Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Lee IJ, Shin DH. Gibberellin-producing endophytic fungi isolated from *Monochoria vaginalis*. J Microbiol Biotechnol. 2010; 20(12):1744–9.

36. Hamayun M, Khan SA, Iqbal I, Ahmad B, Lee IJ. Isolation of a gibberellin-producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and growth promotion of *Crown daisy* (*Chrysanthemum coronarium*). J Microbiol Biotechnol. 2010; 20(1):202–7.
37. You YH, Yoon H, Kang SM, Woo JR, Choo YS, Lee IJ et al. *Cadophora malorum* Cs-8-1 as a new fungal strain producing gibberellins isolated from *Calystegia soldanella*. J Basic Microbiol. 2013; 53(7):630–4. doi: 10.1002/jobm.201200002.
38. Khan AL, Waqas M, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Al-Hosni K et al. Endophytes *Aspergillus caespitosus* LK12 and *Phoma* sp. LK13 of *Moringa peregrina* produce gibberellins and improve rice plant growth. J Plant Interact. 2014; 9(1):731–7. doi: 10.1080/17429145.2014.917384.
39. Yurieva OM, Dragovoz IV, Leonova NO, Ostapchuk AM, Kharkhota MA, Syrchin SO et al. [Gibberellins of endophytic and saprotrophic *Penicillium funiculosum* strains]. Mikrobiol Z. 2017; 79(5):57–69. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.05.057>.
40. Leitão AL, Enguita FJ. Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. Microbiol Res. 2016; 183:8–18. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.004.
41. Khan AL, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee IJ. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. Crit Rev Biotechnol. 2015; 35(1):62–74. doi: 10.3109/07388551.2013.800018.
42. Bilal L, Asaf S, Hamayun M, Gul H, Iqbal A, Ullah I et al. Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. Symbiosis. 2018; 76(2): 117–27. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0545-4>.
43. Al-Hosni K, Shahzad R, Latif Khan A, Muhammad Imran Q, Al Harrasi A, Al Rawahi A et al. *Preussia* sp. BSL-10 producing nitric oxide, gibberellins, and indole acetic acid and improving rice plant growth. J Plant Interact. 2018; 13(1):112–8. doi.org/10.1080/17429145.2018.1432773.
44. Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Rehman G, Sohn EY, Shah AA et al. *Phoma herbarum* as a new gibberellin-producing and plant growth-promoting fungus. J Microbiol Biotechnol. 2009; 19(2):1244–49.
45. Hamayun M, Khan SA, Iqbal I, Na CI, Khan AL, Hwang YH et al. *Chrysosporium pseudomerderium* produces gibberellins and promotes plant growth. J Microbiol. 2009; 47(4):425–30. doi: 10.1007/s12275-009-0268-6.
46. Khan AL, Shinwari ZK, Kim Y, Waqas MU, Hamayun M, Kamran MU et al. Role of endophyte *Chaetomium globosum* LK4 in growth of *Capsicum annuum* by production of gibberellins and indole acetic acid. Pak J Bot. 2012; 44(5):1601–7.
47. Hamayun M, Khan SA, Kim HY, Chaudhary MF, Hwang YH, Shin DH et al. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. J Microbiol Biotechnol. 2009; 19(6):560–5.
48. Tejesvi MV, Kini KR, Prakash HS, Subbiah V, Shetty HS. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. Fungal Diversity. 2007; 24(3):37–54.
49. Arnold AE, Mejía LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. PNAS. 2003; 100(26):15649–54. doi: 10.1073/pnas.2533483100.

50. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. PNAS. 2005; 102(38):13386–91. doi: 10.1073/pnas.0504423102.
51. Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee JH, Lee IJ. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. Proc Biochem. 2011; 46(2):440–7. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.013>.
52. Khan AL, Hamayun M, Ahmad N, Hussain J, Kang SM, Kim YH et al. Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max*. L. J Microbiol Biotechnol. 2011; 21(9):893–902.
53. Khan AL, Hamayun M, Ahmad N, Waqas M, Kang SM, Kim YH et al. *Exophiala* sp. LHL08 reprograms *Cucumis sativus* to higher growth under abiotic stresses. Physiol Plantarum. 2011; 143(4):329–43. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01508.x
54. Khan AL, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Jung HY, Lee JH et al. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. BMC Microbiol. 2012; 12(1):3. doi: 10.1186/1471-2180-12-3.
55. Waqas M, Khan AL, Kamran M, Hamayun M, Kang SM, Kim YH et al. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules. 2012; 17(9):10754–73. doi: 10.3390/molecules170910754.
56. 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; 49:852–62.
57. Khan AL, Lee IJ. Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. BMC Plant Biol. 2013; 13:86. doi: 10.1186/1471-2229-13-86.
58. Radhakrishnan R, Khan AL, Lee IJ. Endophytic fungal pre-treatments of seeds alleviates salinity stress effects in soybean plants. J Microbiol. 2013; 51(6):850–7. doi: 10.1007/s12275-013-3168-8.
59. Muromtsev GS, Krasnopol'skaya L.M. [Micromycetes strain *Fusarium moniliforme* – producer of phytohormones gibberellins A4, A7]. RF Patent № 2084531. Publ. 20.07.1997. Russian.
60. Tudzynski B, Mihlan M, Rojas MC, Linnemannstöns P, Gaskin P, Hedden P. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: des and P450-3 encode GA4 desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. J Biol Chem. 2003; 278(31):28635–43.
61. Albermann S, Elter T, Teubner A, Krischke W, Hirth T, Tudzynski B. Characterization of novel mutants with an altered gibberellin spectrum in comparison to different wild-type strains of *Fusarium fujikuroi*. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(17):7779–90. doi: 10.1007/s00253-013-4917-7.
62. Doaa Abd El monem Emam Sleem. Studies on the bioproduction of gibberellic acid from fungi. A Thesis for the degree of Doctor Philosophy of Science in Botany (Microbiology). Benha University – Egypt. 2013, 163 p.

63. Muddapur UM, Gadkari MV, Kulkarni SM, Sabannavar PG, Niyonzima FN, More SS. Isolation and characterization of gibberellic acid 3 producing *Fusarium* sp. from Belgaum agriculture land Andits impact on green pea and rice growth promotion. *Aperito J Adv Plant Biol.* 2015; 1(2):106. <http://dx.doi.org/10.14437/AJAPB-1-106>.
64. de Oliveira J, Rodrigues C, Vandenberghe LPS, Câmara MC, Libardi N, Socol CR. Gibberellic acid production by different fermentation systems using citric pulp as substrate/support. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:5191046. doi: 10.1155/2017/5191046.
65. Hedden P, Sponsel V. A century of gibberellin research. *J Plant Growth Regul.* 2015; 34(4):740–60. doi: 10.1007/s00344-015-9546-1.

Отримано 11.09.2018