

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи

СТРЕЛЕЦКИЙ

Ростислав Александрович

**Эколого-таксономические аспекты распространения фитогормональной
активности среди дрожжей**

Специальность 03.02.03 – микробиология

Специальность 03.02.08 – экология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук,

Степанов Алексей Львович;

кандидат биологических наук,

Демин Владимир Владимирович

Москва 2017

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Литературный обзор	8
1.1. Растительные гормоны и их происхождение	8
1.2. Физиологические свойства и пути синтеза растительных гормонов в растениях	10
1.2.1. Ауксины	10
1.2.2. Цитокинины	13
1.2.3. Гиббереллины	16
1.3. Синтез фитогормонов микроорганизмами	18
1.3.1. Микробиологический синтез ауксинов	18
1.3.2. Микробиологический синтез цитокининов	22
1.3.3. Микробиологический синтез гиббереллинов	26
1.4. Синтез фитогормонов дрожжами	29
1.5. Общие закономерности проявления фитогормональной активности	33
Глава 2. Объекты и методы	35
2.1. Исследуемые штаммы и их культивирование	35
2.2. Исследуемые растительные гормоны	37
2.3. Определение ауксина в культуральной жидкости дрожжей	37
2.4. Совместное определение ауксина и гиббереллина в культуральной жидкости дрожжей	39
2.5. Определение зеатина в культуральной жидкости дрожжей	43
2.6. Изучение динамики накопления фитогормонов в культуральной жидкости дрожжей	45
2.7. Эксперименты по изучению стимуляции роста дрожжами проростков культурных растений	46
2.7.1. Влияние дрожжей на скорость прорастания пшеницы	46
2.7.2. Влияние культуральной жидкости дрожжей на рост проростков <i>Lepidium sativum</i>	47
2.8. Дополнительные тесты	48
2.8.1. Микроаэрофильный тест	48
2.8.2. Тест при повышенной температуре	48
Глава 3. Результаты и обсуждение	49
3.1. Разработка и адаптация методик по определению фитогормонов в культуральной жидкости	49
3.2. Стабильность фитогормональной активности	54

3.3. Скрининг штаммов дрожжей на присутствие фитогормонов в культуральной жидкости.....	55
3.4. Сравнение фитогормональной активности дрожжей разных филогенетических групп	62
3.5. Сравнение средней фитогормональной активности дрожжей по географическому признаку	66
3.6. Фитогормональная активность дрожжей из различных типов субстратов	71
3.7. Корреляция фитогормональной активности дрожжей с физиологическими и биохимическими свойствами, указывающими на тесную связь с растениями.....	72
3.8. Влияние дрожжей, синтезирующих фитогормоны, на рост и развитие растений.....	79
3.8.1. Влияние дрожжей на скорость прорастания семян пшеницы	79
3.8.2. Влияние культуральной жидкости дрожжей на рост проростков кресс салата	80
3.9. Динамика накопления фитогормонов в культуральной жидкости дрожжей	87
3.10. Дополнительные тесты	94
3.10.1 Фитогормональная активность дрожжей в микроаэрофильных условиях	94
3.10.2. Фитогормональная активность дрожжей при повышенной температуре	96
Заключение.....	98
Выводы	101
Благодарности	102
Список литературы.....	103
Приложение 1.....	115
Приложение 2.....	121
Приложение 3.....	126
Приложение 4.....	128
Приложение 5.....	129
Приложение 6.....	130
Приложение 7.....	131
Приложение 8.....	132

Введение

В настоящее время к дрожжам относят грибы, способные вегетативно размножаться в одноклеточной форме, независимо от того, имеют ли они мицелиальную фазу в жизненном цикле (Чернов, 2013). Благодаря исследованиям ученых со всего мира, в том числе и из лаборатории биологии дрожжей факультета почвоведения МГУ, вопросы географии, динамики и аутоэкологии дрожжей изучены достаточно подробно (Чернов, 2013; Rosa, Peter, 2006). Дрожжи известны как производители ферментов и витаминов (Abbas, 2006), но некоторые аспекты их метаболизма и роли в природе практически не изучены. В том числе, это касается способности к синтезу фитогормонов, определяющих рост и развитие высших сосудистых растений.

Для бактерий и мицелиальных грибов собрано большое количество данных о фитогормональной активности, показано, что большинство представителей самых распространенных родов способно к синтезу тех или иных фитогормонов, также многие виды способны к синтезу нескольких гормонов одновременно в физиологически значимых количествах (Архипова, Шендель, 2011; Karadeniz et al., 2006; Shokri, Emtiazi, 2010; Sutthinan et al., 2010; Pallai et al., 2012; Stirk et al., 2013). Многочисленные исследования доказывают, что бактерии и грибы, выделяя ауксины, цитокинины и гиббереллины, действительно могут стимулировать рост высших растений (Loper, Schroth, 1986; Arkhipova et al., 2007; Reineke et al., 2008; Hussain, Hasnain, 2009; Sachdev et al., 2009; Hamayun et al., 2011; Jiang et al., 2012). Такие эксперименты проводятся и на проростках и на взрослых растениях в вегетационных опытах и исследуют как влияние культуральной жидкости, так и живых клеток микроорганизмов.

Фитогормоны в культуральных жидкостях содержатся в очень низких концентрациях (как правило, 10^{-8} – 10^{-9} М), поэтому их выделение и измерение зачастую является крайне трудоемкой задачей. В последнее время

исследования фитогормональной активности микроорганизмов получили новый импульс для развития, связанный с распространением жидкостных хроматографов оснащенных масс-спектрометрическими детекторами. Имея их на вооружении, исследователи могут работать с небольшими объемами биологического материала и избегать слишком долгой и трудоемкой пробоподготовки, получая при этом достоверные количественные результаты.

Изучение фитогормональной активности дрожжей в последнее время активизировалось после того, как исследователи стали массово выделять дрожжей-эндифитов, в том числе из неповрежденных тканей растений (Исаева и др., 2009; Исаева и др., 2010; Исаева, 2012; Doty, 2013). Появились аргументы, что роль дрожжей в природе намного шире, чем обычно считалось и включает в себя активное симбиотическое взаимодействие с растениями (Чернов, Марфенина, 2010) и лишайниками (Spribille et al., 2016).

В настоящий момент показана способность дрожжей синтезировать ауксин, хотя эти данные зачастую нуждаются в дополнительном подтверждении при помощи масс-спектрометрического анализа (Nassar et al., 2004; El-Tarabily, 2006; Xin et al., 2009; Limtong, Koowadjanakul, 2012; Limtong et al., 2014; Nutaratat et al. 2014; Ignatova et al. 2015; Fu et al., 2016). Недавно появившиеся данные показывают, что способность синтезировать ауксин широко распространена среди аскомицетовых дрожжей (Jaiboon et al., 2016).

Более 30 лет назад было показано, что цитокинины, в частности зеатин, присутствуют в экстракте пивных дрожжей (Staden, 1974; Jameson, Morris, 1989). Эти данные были получены при помощи иммунологических методов и хроматографии. Дальнейшее исследование способности дрожжей к синтезу цитокининов продолжено не было. Информация о способности дрожжей синтезировать гиббереллины отсутствует вовсе. Учитывая вышеизложенное,

основной задачей диссертации стало проведение скрининга природных штаммов дрожжей на присутствие ауксина, цитокинина (зеатина) и гиббереллина (ГК₃) в культуральной жидкости.

Нами ставилась цель не только показать широкое распространение фитогормональной активности среди дрожжей, но также провести анализ ее зависимости от физиологических, филогенетических и экологических свойств штаммов. Данное направление является отражением системного подхода, который преследует своей целью раскрытие общих закономерностей в природе (Заварзин, 2003).

Этот подход отличается от преобладающего в настоящий момент за рубежом, который сосредотачивает внимание на отдельных организмах или группах. В рамках этого подхода изучалась фитогормональная активность бактерий и мицелиальных грибов, поэтому отсутствуют исследования, нацеленные на раскрытие экосистемных зависимостей распространения этого явления. На примере дрожжей нами была поставлена задача закрыть этот пробел.

Выполнение диссертации было бы невозможно без применения новейших аналитических подходов и использования современного оборудования, в частности высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1200, оснащенного новейшим квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором Agilent Technologies 6520 Accurate-Mass Q-TOF. Отдельной задачей в диссертации было поставлено разработать методики для определения фитогормонов в культуральной жидкости дрожжей, учитывающие особенности матрицы и низкие концентрации исследуемых соединений.

Также была проведена ставшая традиционной в такого рода исследованиях экспериментальная работа по определению биологической активности культуральной жидкости дрожжей, показавшая их выраженную способность к стимуляции роста растений.

Итак, цель нашего исследования: оценить фитогормональную активность дрожжей из разных филогенетических и экологических групп и потенциал их влияния на рост растений.

Согласно цели были поставлены задачи:

- 1) Разработать методики количественного определения ауксина, гиббереллина и зеатина для работы с культуральной жидкостью микроорганизмов.
- 2) Провести в стандартных условиях скрининг штаммов дрожжей разных филогенетических и экологических групп на присутствие ауксина, зеатина и гиббереллина в культуральной жидкости.
- 3) Осуществить анализ полученных данных для выявления групп дрожжей наиболее активно синтезирующих фитогормоны.
- 4) Изучить динамику синтеза фитогормонов дрожжами и провести исследования фитогормональной активности в условиях микроаэрофильности и повышенной температуры.
- 5) Исследовать влияние дрожжей-производителей фитогормонов на рост и развитие проростков культурных растений.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Растительные гормоны и их происхождение

В отличие от животных гормонов, растительные не являются белками и узкоспециализированными веществами (Полевой, 1989). По степени распространенности в природе они формируют ряд: ауксины – цитокинины – гиббереллины – абсцизовая кислота – этилен. Фитогормоны синтезируются не только сосудистыми растениями, но также грибами, бактериями и водорослями и интенсивность синтеза у них зачастую намного превосходит растительную. Первые растения находились под своего рода «прессом» из разнообразных продуктов метаболизма симбионтных микроорганизмов. Некоторые из этих веществ позднее стали использоваться растениями как сигнальные для своего роста и развития (Юсуфов, 1996). Это, безусловно, стало возможно только после того как растения выработали механизмы эффективной защиты от экзогенных соединений и при этом сами стали их синтезировать. Основные механизмы защиты – это разрушение и связывание (деактивация) (Алехина, 2005).

В свою очередь, у микроорганизмов данные соединения стали использоваться как инструмент регуляции растительного роста, поэтому многие грибы и бактерии до сих пор способны к синтезу фитогормонов и могут, при определенных обстоятельствах, влиять на рост и развитие растений. При этом сами микроорганизмы чаще всего мало подвержены влиянию фитогормонов, например, *Taphrina epiphylla* никак не реагирует на изменение концентрации ИУК в 10 тыс. раз (Кефели, 1974). Таким образом, между характеристиками синтеза гормонов микроорганизмами и растениями существуют принципиальные различия, обусловленные, в первую очередь, тем, что для микроорганизмов фитогормоны не являются необходимыми для

существования соединениями. Различия в динамике синтеза приведены в таблице 1 (Юсуфов, 1996).

Таблица 1

Особенности синтеза фитогормонов растениями и микроорганизмами (Юсуфов, 1996)

Организм	Содержание фитогормонов	Содержание ингибиторов	Система связывания фитогормонов	Связь с ростом
Микроорганизмы и грибы	+++	–	–	–
Высшие растения	+	+	+	+

Примечание. (+) – заметное, (+++) – избыточное содержание, (-) – отсутствие

Также необходимо отметить, что фитогормоны у растений принципиально отличаются от вторичных метаболитов, так как имеют определенное назначение и сложноорганизованный баланс. У микроорганизмов же, фитогормоны часто рассматриваются вместе с вторичными метаболитами, такими как антибиотики, поскольку синтез их нерегулярен, а назначение зачастую неочевидно.

В настоящее время вещество считается растительным гормоном, если обладает следующими свойствами (Алехина, 2005):

- 1) Вызывает специфический физиологический ответ;
- 2) Синтезируется в растении одной группой клеток, а отвечает на него другая группа (разобщено место синтеза и место действия);
- 3) Практически не играет роли в основном метаболизме клетки, а используется лишь для сигнальных целей;
- 4) Вещество действует в низкой концентрации – не более 0,00005 моль/л.

К этой категории относится небольшое число групп растительных метаболитов: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота и

этилен. Наша работа посвящена первым трем, являющимся стимуляторами роста.

1.2. Физиологические свойства и пути синтеза растительных гормонов в растениях

1.2.1. Ауксины

В 1880 году Ч. и Ф. Дарвины изучали фототропическую реакцию проростков растений (*Phalaris canariensis*). Оказалось, что свет воспринимается верхушкой coleoptilya, хотя фототропический изгиб наблюдается в субапикальной зоне. Соответственно, был сделан вывод, что некий «стимул» перемещается из верхней части coleoptilya в нижнюю и вызывает изгибание (Медведев, 2004). Тем не менее, данное явление, могло быть вызвано не только химическими веществами, но также, например, электрическими импульсами (Алехина и др., 2005).

Н.Г. Холодный и Ф.В. Вент в 1930 году провели эксперимент с декапитированными побегами: срезанные апексы расположили на агаровом геле, а на декапитированное растение сбоку накладывали на срез кубик агара пропитанный экстрактом. Растение изгибалось в противоположную от наложенного кубика сторону. Удалось также установить, что ауксин движется полярно – от апекса побега к основанию, а затем – к апексу корня. Скорость транспорта ауксинов, по их данным, составила от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров в час (Уоринг, Филипс, 1984; Якушкина, Бахтенко, 2005).

Немецкий химик Ф. Кёгль выделил в 1939 году из мочи вегетарианцев индолилуксусную кислоту (ИУК). Выяснилось, что ИУК усиливает рост проростков с отрезанной верхушкой подобно ауксину. Вскоре ИУК была выделена из верхушек побегов, и таким образом было показано, что ИУК

является одним из естественных ауксинов. Синтезируются ауксины в растении разными путями (рис. 1).

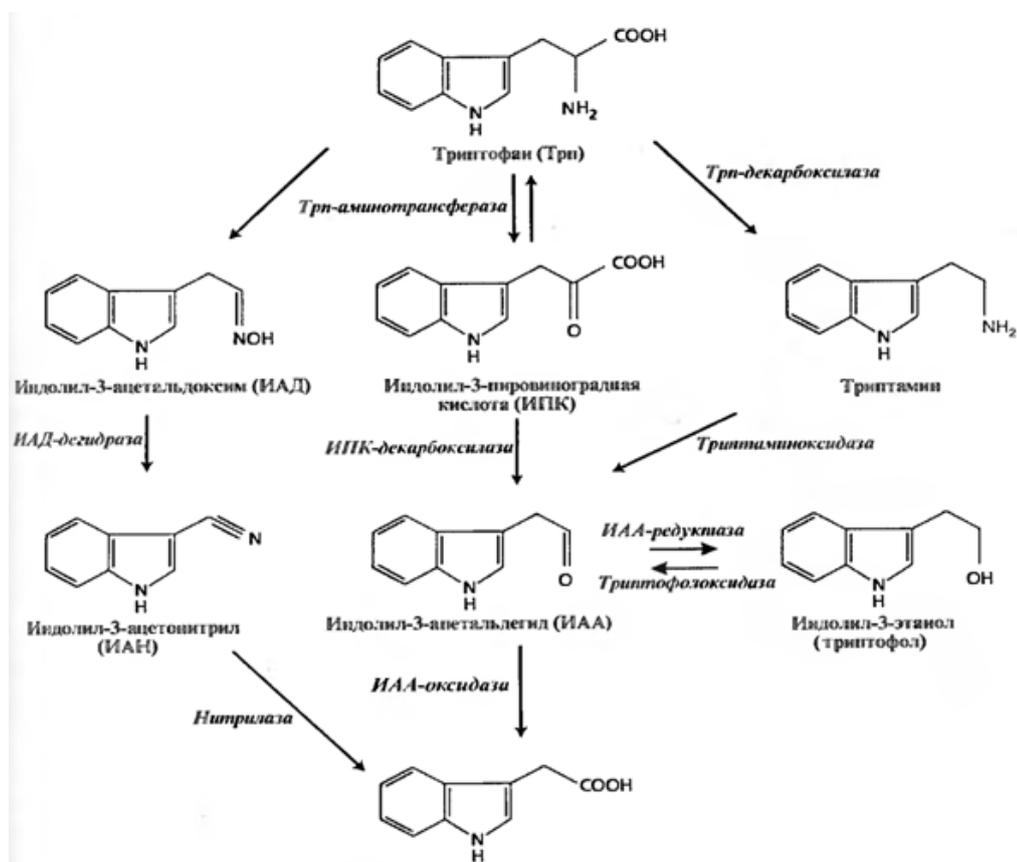


Рисунок 1. Триптофан - зависимые пути синтеза ИУК (Медведев, 2004).

Существует три триптофановых пути синтеза ауксинов, но, судя по наблюдениям за мутантными растениями, неспособными к синтезу триптофана, есть и нетриптофановые пути синтеза.

По мере удаления от точки синтеза концентрация ауксинов падает за счёт необратимого окисления ИУК-оксидазой (специфически) или полифенолоксидазой (неспецифически) (Алехина и др., 2005).

Большая часть ауксинов находится в растениях в конъюгированной форме – с глюкозой, миоинозитом, аспартамом (Медведев, 2004).

Ауксины обладают следующими специфическими эффектами, отличающими их от других фитогормонов (Медведев, 2004):

- 1) Индукция удлинения изолированных coleoptiles или отрезков стебля;

- 2) Индукция деления клеток в каллусной культуре в присутствии цитокинина;
- 3) Стимуляция образования боковых корней у стеблевых черенков (ризогенез);
- 4) Индукция роста партенокарпических плодов (обработка ауксинами бессемянных плодов вызывает их развитие, как у «нормальных» (Гэлстон и др., 1983));
- 5) Индукция образования этилена. На этом основано действие искусственных ауксинов для которых нет систем инактивации – они вызывают сверхпродукцию этилена и как следствие, опадение листьев (Алехина и др., 2005)

Процессы, регулирующие концентрацию ауксина:

- 1) образование гормона;
- 2) ферментное разрушение;
- 3) Инактивация ИУК за счет связывания, позволяющая в последствии высвободить вещество;
- 4) Регуляция передвижения ИУК к тканям и органам (Уоринг, Филипс, 1984).

Ауксин играет важнейшую роль в «тропизмах» и «настиях», оказывает аттрагирующий (притягивающий) эффект, обуславливает апикальное доминирование. Ауксины присутствуют во всех тканях растения, но особенно их много в апикальных меристемах, молодых побегах и формирующихся плодах (Медведев, 2004).

Стоит отметить, что хотя многие индольные соединения ауксинового ряда обладают биологической активностью, наиболее эффективна, распространена в природе и изучена 3-индолилуксусная кислота.

1.2.2. Цитокинины

В лаборатории Скуга с 1940 года велись поиск соединений, вызывающих, пролиферацию культуры тканей табака. Только в 1955 году из автоклавированных препаратов молока сельди удалось выявить фактор клеточного деления. Выяснилось, что в перегретом препарате ДНК есть вещество, которое на фоне ауксина вызывает деление клеток, - фурфуриладенин (Уоринг, Филипс, 1984; Медведев. 2004). По физиологическому эффекту вещество назвали кинетином (от греч.kinesis – деление), так как стимулировала митоз. Первый растительный цитокинин был выделен из зерновок кукурузы (zea – кукуруза). Так была открыта новая группа фитогормонов – цитокинины, отличающиеся специфическим свойством – они стимулируют деление клеток в кулусной культуре в присутствии ауксина. Зеатин является доминирующей формой цитокининов в растениях. Все известные цитокинины это производные пуриновых азотистых оснований, а именно аденина, в котором аминогруппа в шестом положении замещена различными радикалами (Якушкина, Бахтенко, 2005). Схема синтеза цитокининов приведена на рисунке 2.

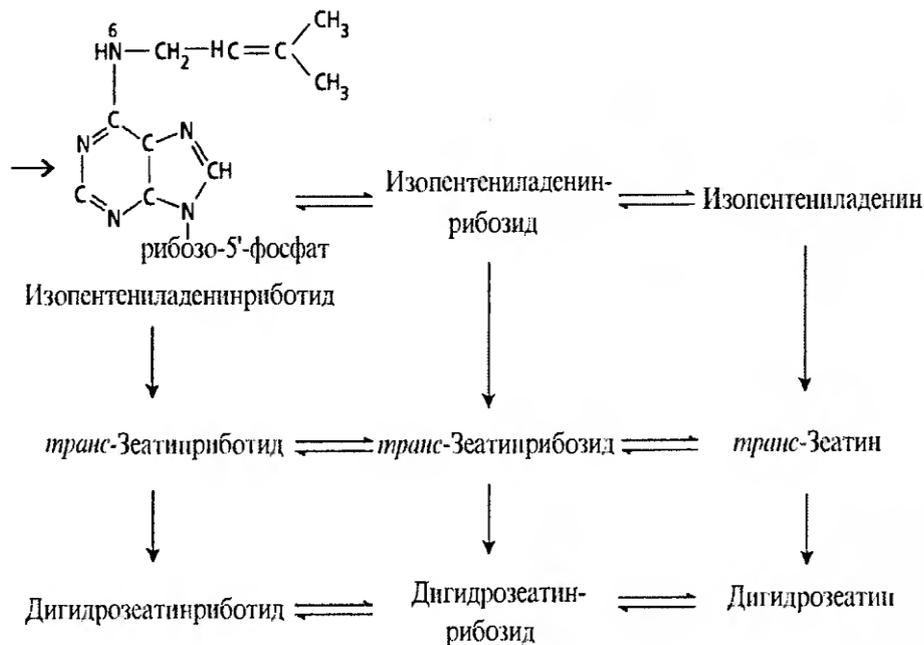
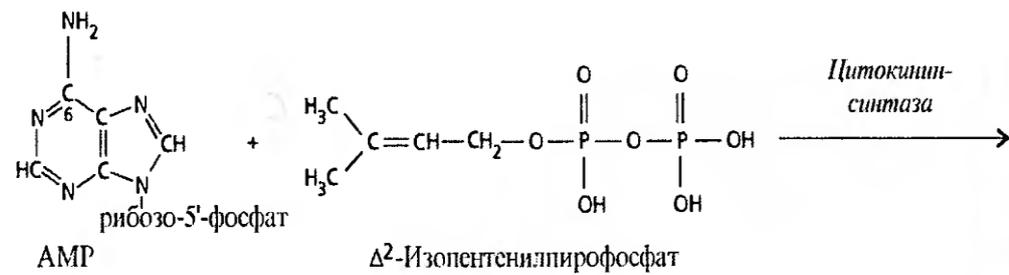


Рисунок 2. Схема биосинтеза цитокининов (Медведев, 2004)

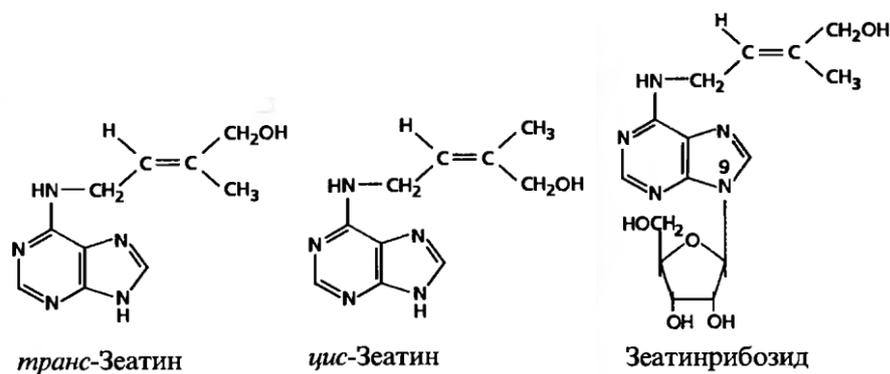


Рисунок 3. Некоторые цитокинины (наиболее распространенные в природе) (Медведев, 2004)

Цитокинины включают в себя ряд соединений (рис. 3). В клетке они могут находиться в активной и неактивной формах. Цитокинины связываются

в N9-гликозиды и гликозиды по гидроксилам изопентенильного фрагмента. Из-за отсоединения изопентильной группировки цитокинины разрушаются и их концентрация падает по мере удаления от точки синтеза.

Цитокинины, по сути, являются антагонистами ауксинов в аспекте влияния на рост растений. Это наиболее заметно в экспериментах с каллусными культурами – изменение соотношения ауксинов и цитокининов направляет рост либо в сторону роста стеблевой части (цитокинины), либо в сторону корней (ауксины). У цитокининов также иная точка синтеза. Если ауксины синтезируются в апексе побега, то цитокинины – биохимический маркер апекса корня. Ауксин транспортируется по растению сверху вниз и активно, а цитокинин снизу вверх и пассивно.

Спектр действия цитокининов (Якушкина, Бахтенко, 2005; Медведев, 2004; Алехина и др., 2005):

- 1) Аттрагирующий эффект. Растущие ткани корня притягивают питательные вещества;
- 2) Образовательная функция. Цитокинины обуславливают развитие флоэмы;
- 3) Подавление роста боковых корней;
- 4) Снятие апикального доминирования;
- 5) Регуляция устьичного аппарата. Если вода поступает из корня, то есть, обогащена цитокининами, то устьица открываются;
- 6) Стимулирующая функция. Цитокинины стимулируют рост бессемянных плодов.
- 7) Замедление старения листьев, через задержку распада хлорофилла;
- 8) Способствуют выходу семян из покоя.

1.2.3. Гиббереллины

Растения риса часто поражаются аскомицетовым грибом *Gibberella fujikuroi*. Растения чрезмерно удлиняются и полегают. Еще в 1912 японский химик Савада предположил, что симптомы заболевания обусловлены действием какого-то химического вещества. В 1938 году химики Ябуга и Сумики выделили два вещества, которые назвали гиббереллинами «А» и «В». Структурная формула гиббереллина «А» была установлена в 1954 году английскими биохимиками Кроссом и Куртисом (Медведев, 2004). Затем было выяснено, что растения вырабатывают похожие по структуре соединения - эндогенные гиббереллины, их принято обозначать GA (ГК) с соответствующим индексом (Уоринг, Филипс, 1984) (рис. 4).

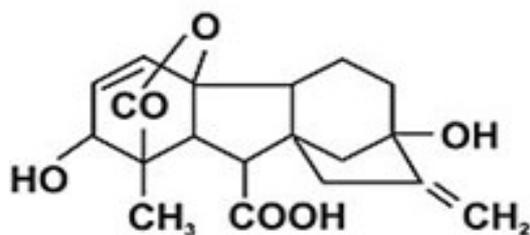


Рисунок 4. Гиббереллиновая кислота (ГК₃ или гиббереллин), самое распространенное соединение в группе.

Индексы являются условными и не отражают схожести химической структуры или величины активности. Гиббереллины представляют собой тетрациклические дитерпеновые кислоты и делятся на две группы: имеющие 20 или 19 атомов углерода. Непосредственный предшественник гиббереллинов – *энт*-каурен. Биосинтез гиббереллинов завершается образованием более 100 веществ, из которых биологической активностью обладают не все. К тому же, действие гиббереллинов бывает видоспецифично (Гэлстон, Девис, 1983). Гиббереллины называют

«гормонами благополучия зеленого листа». Они синтезируются в основном в листьях, но могут синтезироваться и в корнях.

Самый распространенный эффект гиббереллинов – удлинение стебля. Также вызывают увеличение количества междоузлий. Так же как и ауксины, стимулируют развитие бессемянных плодов. Гиббереллины, в отличие от ауксинов, вызывают процессы деления и растяжения клеток интеркалярных меристем. Гиббереллины выводят семена из покоя, контролируя три процесса - рост зародыша, размягчение слоев эндосперма и мобилизацию запасных веществ (Медведев, 2004).

В ряде случаев гиббереллины вызывают увеличение общей массы растения, вызывая таким образом, не перераспределение, а накопление питательных веществ (Якушкина, Бахтенко, 2005).

В 1970-х под руководством М.Х. Чайлахяна исследовали регуляцию пола у огурца и конопли. Огурцы образуют мужские и женские цветки на одном экземпляре, а конопля - двудомное растение. Обработка ГК вызвала увеличение процента мужских растений у конопли и увеличила закладку мужских цветков на огурцах. Как впоследствии выяснилось, пол этих растений зависел также от генетической линии, к которой они принадлежали. Тем не менее, можно утверждать, что уровень гиббереллинов имеет влияние на пол растения, хотя это не единственный фактор.

Гиббереллины стимулируют цветение некоторых растений. Обычно уровень эндогенных ГК повышается при увеличении длины дня. Некоторые виды, цветущие на длинном дне, можно заставить цвести с помощью гиббереллинов (Чайлахян и др., 1982).

1.3. Синтез фитогормонов микроорганизмами

1.3.1. Микробиологический синтез ауксинов

Являясь самым распространенным растительным гормоном в природе, ауксин хорошо изучен не только в аспекте его роли в росте и развитии высших растений, но также как вторичный метаболит очень многих грибов и бактерий.

Известно, что бактерии *Pseudomonas aureantiaca* и *Pseudomonas extremorientalis* с помощью выделяемой ими ИУК стимулируют прорастание семян пшеницы при солевом стрессе (Egamberdieva, 2009). Штаммы вида *Klebsiella pneumonia*, выделенные из ризосферы пшеницы, синтезируя ауксин, также способны стимулировать рост корней и проростков этого растения (Sachdev et al., 2009). Более 30 лет назад показано, что *Azospirillum brasilense* стимулирует рост проса, в том числе за счет выделения ауксинов. Стимуляция выражалась в увеличении количества боковых корней и корневых волосков у инокулированных растений в жидкой среде. Было отмечено, что встряхивание во время культивирования увеличивает выход ауксина, так же как и добавка триптофана. (Tien et al., 1979). Концентрация ауксина достигала 24 мкг/мл среды при добавке азота.

Исследования, проведенные на *Klebsiella oxytoca*, выделенной из ризосферы *Aspidosperma polyneuron*, показали что, микроорганизмы сохраняют или даже увеличивают способность к синтезу ауксина при иммобилизации на неорганических матрицах, в то время как свободные клетки постепенно теряют способность к синтезу ауксина (Celloto et al., 2012).

Есть данные, что в вегетационном опыте ауксиногенные бактерии (*Pseudomonas* sp и *Burkholderia* sp) вместе с почвенными нематодами

оказывают положительное влияние на рост корневой системы *Arabidopsis thaliana* (Jiang et al., 2012).

Присутствие ауксиногенных бактерий – серьезная проблема, возникающая при работе с культурами растительных клеток и тканей. Бактерии родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Wautersia* (*Ralstonia*) и *Stenotrophomonas* присутствуют в культурах клеток и тканей и, выделяя ИУК, могут исказить результаты экспериментов (Lata et al., 2006).

К синтезу ИУК способны также симбионтные и несимбионтные азотфиксаторы следующих родов: *Agrobacterium*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella* и *Azotobacter* (Shokri, Emtiazi, 2010). Максимальная активность наблюдалась у *Rhizobium* и *Paenibacillus* - до 5,23 мкг/мг биомассы, причем, когда представители этих родов культивировались вместе, ауксиногенная активность повышалась.

Скрининг PGPR (plant growing promotion rhizobacteria), выделенных из ризосферной зоны почвы и клубеньков, показал, что до 80% исследованных штаммов *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Mesorhizobium* способны к синтезу ИУК. Среди рода *Bacillus* только 20% штаммов оказались активны (Ahmad et al., 2008). Можно полагать, что стимулирующий эффект препаратов на основе азотфиксаторов связан, в том числе, и с их способностью к синтезу ауксина.

Бактерии родов *Sphingomonas*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas* и *Micrococcus* выделенные из ризосферы орхидей *Dendrobium moschatum* и *Acampe papillosa* продемонстрировали ауксиногенную активность на уровне до 90 мкг/мл среды при условии добавки триптофана на уровне 200 мкг/мл (Tsavkelova et al., 2005).

Обнаружено, что, способность клубеньковых бактерий синтезировать ауксин возрастает под воздействием флавоноидов, выделяемых растением хозяином для запуска процессов образования клубеньков (Prinsen et al. 1991).

Это говорит в пользу теории о взаимовлиянии микроорганизмов-симбионтов и растений через выделение фитогормонов в естественных условиях.

Вообще, нельзя точно сказать, что ассоциированные с растениями микроорганизмы более активны в производстве ИУК и что среди них это явление шире распространено. Хотя большое количество данных указывает на высокую ауксиногенную активность PGPR микрофлоры, тем не менее, не ассоциированные с растениями виды, зачастую также синтезируют ИУК.

Актиномицеты рода *Streptomyces* также обладают выраженной способностью к синтезу ауксина, причем концентрации ИУК достигали 300 мкг/мл при условии добавки дрожжевого экстракта и L-триптофана (Sutthinan et al., 2010). Культуральная жидкость стимулировала прорастание и рост корней кукурузы.

Что касается динамики накопления ауксина, то имеются сведения, полученные при исследовании культуры *Rhizobium* sp., что накопление ауксина происходит линейно, достигая максимума в стационарной фазе роста культуры (рис. 5). Дальнейшее снижение концентрации ИУК обусловлено действием разрушающих ауксин ферментов, оксидаз и пероксидаз (Ghosh, Basu, 2002)

Синтезируют 3-индолилуксусную кислоту и некоторые микроводоросли, такие как *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae* и *Charophyceae* (Stirk et al., 2013). Концентрации ауксина в их культуральной жидкости были от 0,5 до 71,49 нМ/г сухого веса.

Многие фитопатогенные грибы – галлообразователи, а также микоризные грибы способны к синтезу ИУК, среди них *Taphrina*, *Phytophthora*, *Ustilago*, *Colletotrichu*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Amanita*, *Rhizopogon*, *Paxillus*. Среди микромицетов синтез ауксина также широко распространен, к нему способны представители родов *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Tsavkelova et al., 2006).

Показано, что *Aspergillus niger*, образующий черную плесень в помещениях и опасный для человека, является активным производителем ауксина – до 128,3 мг/л (Wilkaу et al., 2010). Также в данном исследовании было обнаружено, что на синтез ауксина грибом и его рост положительно влияет добавка гиббереллина в культуральную жидкость.

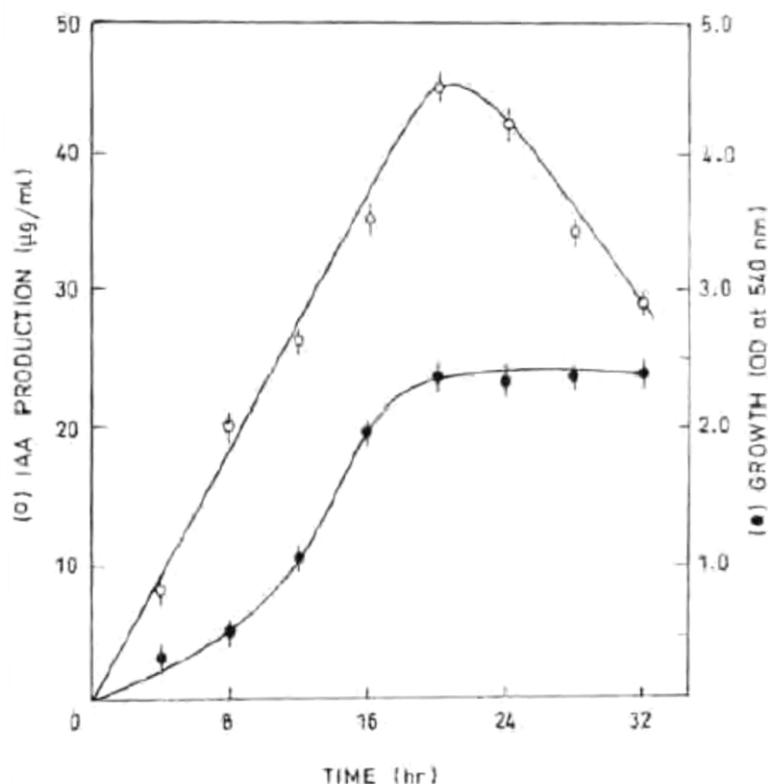


Рисунок 5. Динамика роста культуры *Rhizobium sp* (OD) и накопления ауксина (мкг/мл) в культуральной жидкости (Ghosh, Basu, 2002)

Показано, что фоллиарная обработка листьев полевицы клетками *Pythium aphanidermatum*, активным производителем ауксина приводит к увеличению содержания ИУК в листьях в 200 раз (до 9760 нг/г сырой массы) и запускает инфекционный процесс (Shimada A. et al., 2005).

Тем не менее, не всегда инфекционный процесс и фитогормональная активность связаны между собой. Например, гриб *Ustilago maydis* поражает растения кукурузы, вызывая формирование опухолей. В этих опухолях возникает повышенная концентрация ИУК из-за фитогормональной активности гриба. Впрочем, оказалось, что мутанты, неспособные к синтезу

ИУК, все равно вызывали развитие опухоли, то есть инфекционный процесс оказался не связан с ИУК, производимой грибом (Reineke et al., 2008).

Важно подчеркнуть, что интенсивность синтеза ауксина значительно зависит от условий культивирования, что несколько затрудняет сравнение абсолютных значений активности из разных источников.

У микробов 3-индолилуксусная кислота может синтезироваться тремя путями (Tsavkelova et al., 2006):

- 1) Синтез через индол-3-пировиноградную кислоту и индол-3-уксусный альдегид. Это основной путь синтеза, наблюдаемый у грибов и бактерий;
- 2) Превращение триптофана в индол-3-уксусный альдегид может включать альтернативный путь синтеза при котором образуется триптамин. Данный путь встречается у микоризный грибов и цианобактерий.
- 3) Формирование ИУК через индол-3-ацетамид. Встречается у фитопатогенных бактерий и грибов.

Нетриптофановые пути синтеза не играют важной роли в образовании ИУК микроорганизмами и малоизучены.

1.3.2. Микробиологический синтез цитокининов

В последние годы стало больше информации о способности бактерий производить цитокинины, что связано, в первую очередь, с развитием аналитических методов, в частности, широкого распространения масс-спектрометров.

Многие фитопатогенные грибы и бактерии вырабатывают цитокинины. Гриб подаёт запрос на питательные вещества и растение само направит их к месту инфекции. На пораженном участке возникает опухоль, из которой растут многочисленные побеги – «ведьмина метла». К примеру, бактерии

Pseudomonas savastanoi вырабатывают цитокинин и ауксин. Они поражают сирень, бирючину, оливу (Алехина и др., 2005).

Российскими авторами (Архипова, Шендель, 2011) показано, что инокуляция ризосферы пшеницы штаммами *Bacillus* sp. приводит к увеличению содержания зеатинрибозида в корнях и затем в стеблях. Растущие растения активнее выделяли аминокислоты в ризосферу, которые затем могли быть использованы в качестве субстрата для микроорганизмов. То, что бактерии этих родов выделяют цитокинины, было подтверждено анализом культуральных жидкостей при помощи иммуноаффинной и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Было показано, что инокуляция пшеницы малоактивными штаммами мало влияла на уровень цитокининов в растениях. Показано также, что в условиях нехватки влаги, которая приводит к недостатку эндогенных цитокининов, выделение этих фитогормонов штаммами *Bacillus* sp. позволяет привитым растениям пшеницы сохранять нормальный рост побегов (Arkhipova et al., 2007). Аналогичные результаты были получены также на салате (Arkhipova et al., 2005).

Штаммы *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из ризосферы различных растений, были отобраны как активные производители зеатина по способности культуральной жидкости стимулировать образование хлорофилла в этиолированных семядолях огурца (Hussain, Hasnain, 2009). Максимальные концентрации цитокининов наблюдались на последних стадиях роста *Bacillus licheniformis* – 1091,9 нг/мл транс-зеатина и 521 нг/мл зеатинрибозида. Показано, что концентрация цитокининов возрастает линейно в фазе экспоненциального роста культуры и стабилизируется в стационарной фазе (рис. 6). Данный тип динамики характерен для вторичных микробных метаболитов типа антибиотиков (Егоров, 2004).

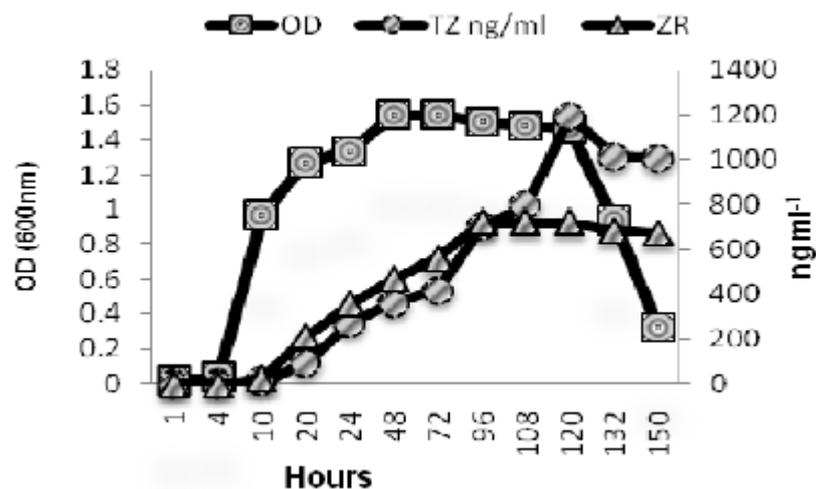


Рисунок. 6. Динамика роста культуры *Bacillus licheniformis* (OD) и накопления транс-зеатина «TZ» (нг/мл) и зеатинрибозида «ZR» (нг/мл) в культуральной жидкости (Hussain, Hasnain, 2009)

Pseudomonas fluorescens улучшает рост корней капусты в гнобиотических условиях. Исследованный штамм наряду со способностью к синтезу цитокининов, сравнительно малоактивный производитель ауксина, но при этом обладает ярко выраженной способностью к колонизации поверхности корней (Pallai et al. , 2012).

Исследование способности к синтезу цитокининов среди эндофитов показал, что выделенные из листьев гинеры распростертой (*Gynura procumbens*) штаммы *Pseudomonas resinovorans* и *Paenibacillus polymaxa* синтезируют цитокинины. Эти данные были получены при помощи теста на изменение содержания хлорофилла в семядолях (Bhore et al., 2010). *Acenitobacter calcoaceticus*, также выделенная из гинеры в данном эксперименте, не продемонстрировала цитокининовой активности по данным теста на хлорофилл.

Стоит отдельно отметить, что влияние бактерий на рост растений в тестах обусловлено зачастую не только цитокининами, но также ауксином, поскольку известно, что бактерии зачастую обладают способностью к его синтезу.

Бактерии рода *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*) в культуре способны к синтезу транс-зеатина на уровне от 0,45-44 мкг/л. Было показано, что у данных видов за синтез транс-зеатина отвечают идентичные участки ДНК (Akiyoshi et al., 1987).

Обнаружено, что выделенные в море и морских отложениях бактерии синтезируют цитокинины на уровне 0,05-0,30 мкг зеатин экв/л культуральной жидкости. Причем среди осадочных штаммов доля активных было 45-55%, в то время как среди выделенных из воды 5-15%. Была выявлена штаммовая зависимость способности к синтезу цитокининов, т.е. не была обнаружена связь цитокининовой активности с видовой принадлежностью бактерий (Miyayama et al., 1986). Остается дискуссионным вопрос о роли бактериальных цитокининов в морских экосистемах, возможно, что с ними связано водорослевое «цветение» воды.

Цитокининовая активность характерна и для грибов многих родов, таких как *Dictiostellium*, *Fusarium*, *Paxillus*, *Phoma*, *Rhizopogon*, *Schizophyllum*, *Suillus*, *Taphrina*, *Trichoderma*, *Uromyces* (Tsavkelova et al., 2006; и Gogala N., 1991).

Цитокинины обнаружены у многих видов морских и пресноводных водорослей (*Gymnodinium splendens*, *Cricisphaera spp*, *Laminaria digitata*, *Hypnea muskiformis*, *Volvox carteri*) (Медведев, 2004).

Микроводоросли *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae* и *Charophyceae* производят и цитокинины и ИУК. Уровень цитокининов колебался от 0,29 до 21,40 нМ/г сухой массы и было обнаружено, что способность производить зеатин у морских водорослей имеет штаммовую зависимость. (Stirk et al., 2013).

Следует обратить внимание на то, что цитокинины – это целый ряд различных производных аденина, многие из которых встречаются в живой клетке. Тем не менее, исследователи обычно занимаются изучением цис и транс - зеатина и зеатинрибозида. Это связано с тем, что эти цитокинины

наиболее распространены в природе (Tarkowski et al., 2009). Причем водоросли синтезируют преимущественно цис - форму зеатина, в то время как бактерии производят транс – зеатин (Stirk et al., 2013).

Существует 2 основных пути синтеза цитокининов у микроорганизмов (Tsavkelova et al., 2006):

- Через разрушение тРНК. Данный путь приводит к формированию цис-зеатина основывается на действии фермента изопентилтрансферазы, обнаруженной у фитопатогенных грибов.
- Синтез *de novo* из изопентилпирофосфата и аденозин-5-монофосфата также с помощью изопентилтрансферазы. Этот путь характерен для фитопатогенных бактерий.

1.3.3. Микробиологический синтез гиббереллинов

Показано, что среди грибов способность к синтезу гиббереллинов распространена довольно широко, а не является свойством представителей рода *Fusarium*. Например, почвенный гриб нового рода *Neosartorya*, выделенный из корней китайской капусты (*Bassica rapa*), также активно синтезирует гиббереллины. Спектр синтезируемых гиббереллинов включает GA₃, GA₄, GA₇, GA₉, GA₁₅, обнаруженная активность соответственно 1,42 нг/мл, 5,93 нг/мл, 11,36 нг/мл, 3,2 нг/мл; 0,79 нг/мл; 1,18 нг/мл. Культуральная жидкость этого гриба стимулирует рост китайской капусты в длину и способствует увеличению биомассы растения (Намаюн et al., 2011). Что касается связи патогенности и фитогормональной активности, то проведено исследование штаммов *Fusarium culmorum*, один из которых был патогенным, а другой оказывал стимулирующее действие на рост растений (PGPF) (Jaroszuk-Ścisiel et al., 2014). Патогенный штамм синтезировал в 4 раза меньше гиббереллина, чем полезный штамм. Также патогенный штамм оказался в 3 раза менее активен по производству ауксина, чем полезный

штамм. Максимальная гиббереллиновая активность полезного штамма была порядка 55 мкг/мл культуральной жидкости. Патогенный штамм при этом производил в 10 раз больше этилена, чем PGPF штамм. Т.е. по данным этого исследования патогенность не обязательно связана с синтезом гиббереллина и ауксина, но, вероятно, имеет связь с синтезом гормонов-ингибиторов, к коим относится этилен наряду с абсцизовой кислотой.

При исследовании фитогормональной активности *Aspergillus niger*, активного производителя ауксина, также обнаружена выраженная способность к синтезу гиббереллина – 238,7 мг/л. Показано, что добавка в среду ауксина увеличивает синтез гиббереллина и биомассу гриба по сравнению с контрольным вариантом (Wilka et al., 2010).

Вообще, довольно часто одновременно проводят измерения ауксина (3-индолилуксусной кислоты) и гиббереллинов, так как эти соединения являются кислотами, могут экстрагироваться вместе и на растения действуют во многом однонаправленно.

Также многие бактерии могут синтезировать гиббереллин (GA_3). К таким бактериям относятся *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Escherichia coli*. Примечательно, что исследуемые штаммы были способны также к синтезу ауксина, зеатина и абсцизовой кислоты. Максимальная обнаруженная концентрация гиббереллина составила 705,2 мкг/л у штамма *Proteus mirabilis* (Karadeniz et al., 2006).

Исследование 10 диких и мутантных (*nod*, *fix*⁻) штаммов *Rhizobium phaseoli* показало, что все они способны к синтезу GA_1 и GA_4 , а некоторые также к синтезу GA_9 и GA_{20} . Все штаммы также оказались способны к синтезу ауксина, но зависимости между ауксиновой и гиббереллиновой активностью обнаружено не было. Так как неспособные к образованию клубеньков и фиксированию азота мутанты также продолжали производить

гормоны, можно сделать вывод о том, что азотфиксирующая способность не связана с фитогормональной активностью (Atzorn R. et al. 1988).

Что касается динамики синтеза гиббереллина у микроорганизмов, то, как показано на примере бактерии рода *Pseudomonas* sp., выделенной из отходов переработки оливок, она соответствует динамике, характерной для вторичных метаболитов (Karakoç, Aksöz, 2006) (рис. 7)

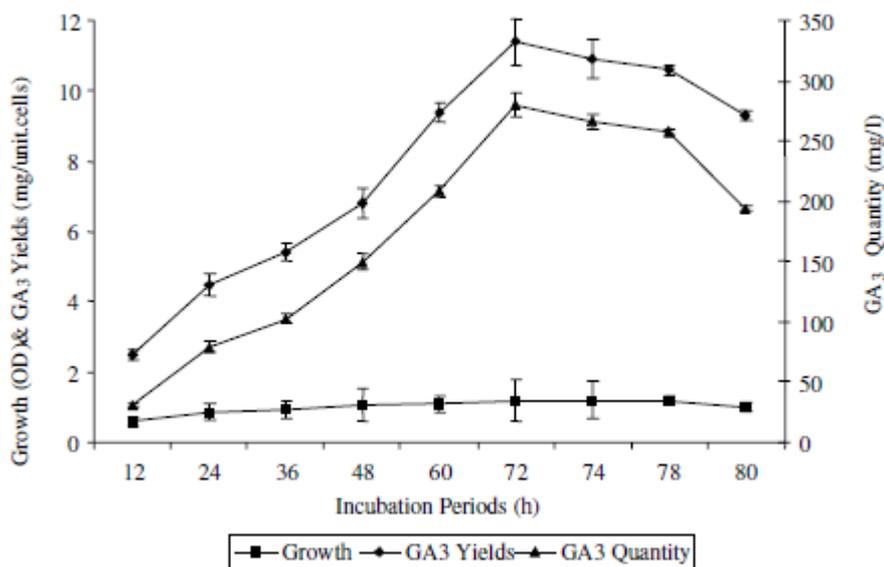


Рисунок. 7. Динамика роста культуры *Pseudomonas* sp. (OD) и накопления гиббереллина (GA₃) культуральной жидкости (мг/л и мг/ед. клеток) (Karakoç, Aksöz, 2006)

В данном исследовании концентрация гиббереллина в культуральной жидкости при оптимальных условиях составила 285,06 мг/л.

Синтез гиббереллина связан с циклизацией геранил-геранил пирофосфата (GGPF), происходящей за счет специфического фермента GGPF-синтазы и приводящей в итоге к формированию энт-каурена – циклического дитерпена, предшественника гиббереллинов (Tsavkelova et al., 2006).

1.4. Синтез фитогормонов дрожжами

Дрожжи – типичные обитатели филлосферы (Inacio et al., 2002; Глушакова, 2006; Глушакова, Чернов, 2007; Глушакова и др., 2007; Глушакова, Чернов, 2010), но их фитогормональная активность дрожжей была мало исследована и только в последнее время ей начали уделять должное внимание.

Более 30 лет назад было показано, что цитокинины, в частности зеатин, вероятно, присутствуют в экстракте пивных дрожжей (Staden, 1974; Jameson, Morris, 1989). Эти данные были получены при помощи иммунологических методов и хроматографии. Исследования способности дрожжей синтезировать цитокинины продолжены не были.

Первые работы по обнаружению ауксина у дрожжей последовали вскоре за обнаружением способности дрожжевых грибов развиваться эндофитно (El-Tarabily, 2006; Nassar et al., 2004). Было предположено, что, развиваясь внутри растительных тканей, и не причиняя растению никакого вреда, дрожжи стимулируют различные ростовые процессы в растительном организме.

В 2004 году было обнаружено, что дрожжи вида *Cyberlindnera saturnus*, выделенные из корней кукурузы и выращенные в культуре, способны к производству индолилуксусной кислоты. *C. saturnus* был отобран из 24 видов эндофитных дрожжей и искусственно инокулирован в исследуемые растения кукурузы. В почву, где росли растения с инокулированными дрожжами *C. saturnus*, был добавлен L-триптофан (L-Trp), являющийся предшественником ауксина. В тоже время почва под некоторыми привитыми растениями не была удобрена триптофаном и таким образом исследовалась способность *S. saturnus* к стимулированию роста кукурузы при отсутствии триптофана.

Выяснилось, что «инокулированные» растения демонстрируют ускоренный рост по сравнению с «неинокулированными», причем первые, растущие в почве, удобренной триптофаном, показывают лучший рост. Хотя и у растений на «неудобренной» почве, но с инокулированными в корни дрожжами *S. saturnus* также наблюдался ускоренный рост (Nassar et al., 2004). Для подтверждения способности дрожжей выделять ИУК, штаммы *S. saturnus* наращивали в жидкой среде и в ней был обнаружен ауксин в концентрации 9,67 мг/л без добавки триптофана и 22,51 мг/л с добавкой.

В 2007 году было обнаружено, что *Cryptococcus laurentii* подавляет рост голубой плесени (*Penicillium expansum*) на плодах груши, причем этот эффект усиливается в присутствии N⁶ – бензиладенина (6-BA), одного из цитокининов, который сам по себе также ингибировал рост гриба. Тем не менее, максимальные эффекты наблюдались при совместном применении *Cryptococcus laurentii* и 6-BA (Zheng et al., 2007). Это позволяет предположить, что дрожжи способны к синтезу цитокининов. Это подтверждение подкрепляется информацией о том, что добавка дрожжевого экстракта ускоряет рост растительного каллуса и усиливает соматический эмбриогенез (Al-Khaugī., 2011). На этом информация о способности дрожжей к синтезу цитокининов заканчивается.

Исследования ауксиновой активности были продолжены.

В 2009 году из веток тополя были выделены штаммы дрожжей, относящиеся к видам *Rhodotorula graminis* и *Rhodotorula mucilaginosa*, которые были способны синтезировать ИУК (до 40 мг/г сухой массы). Для сравнения, ауксин был измерен в культуральной жидкости пекарских дрожжей и там его обнаружить не удалось (Xin et al., 2009). В 2012 году тайландскими исследователями была выпущена статья о способности дрожжей из филлопланы производить ауксин (Limtong, Koowadjanakul, 2012). В качестве объекта были выбраны дрожжи из семи провинций

Таиланда, относящиеся к 36 видам, выделенные из листьев тропических растений. 97% выделенных штаммов относились к аскомицетам.

Оказалось, что из выделенных 114 штаммов, относящихся к 36 видам, синтезируют ауксин только 39 штаммов, относящиеся к 20 видам. Причем, разные штаммы одного и того же вида демонстрировали разную способность к производству ИУК, например, 3 штамма вида *Candida glabrata* показали ауксиногенную активность в размере 0; 25,7; 50,2 мкг/мл. Все исследованные штаммы вида *Candida maltosa* оказались способны к синтезу ИУК, причем этот же вид оказался наиболее активным производителем ИУК – до 234,1 мкг/мл. Таким образом, исследователи показали, что ауксиногенная активность – широко распространенное явление среди дрожжей в исследуемом регионе, но, тем не менее, не все виды способны выделять ИУК. Также можно констатировать, что ауксиногенная активность зависит от свойств конкретных штаммов.

Также в этой работе было проведено изучение ауксиногенной активности 10 штаммов дрожжеподобного гриба *Aureobasidium pullulans*. Этот вид широко распространен в филлоплане местных видов растений. Оказалось, что из 10 исследуемых штаммов, 9 способны производить ИУК. Хотя ауксиногенная активность *Aureobasidium pullulans* оказалась ниже, чем у дрожжей, распространено данное явление в пределах этого вида шире, чем в среднем по другим видам в рамках рассматриваемой работы.

В 2014 году те же авторы (Limtong et al., 2014) опубликовали исследование дрожжей, выделенных из филлопланы сахарного тростника. Из 94 образцов были выделены 158 штаммов дрожжей из которых 69% относились к аскомицетам. 69 штаммов оказались способны к синтезу ИУК, максимальная концентрация составила 565, 1 мг/л у штамма *Rhodospiridium fluviale*. Культивирование производилось с добавкой триптофана в количестве 1г/л.

Исследование фитогормональной активности дрожжей Таиланда было продолжено также скринингом 1034 эпифитных и эндофитных штаммов, выделенных из риса и сахарного тростника (Nutaratat et al. 2014). 168 штаммов оказались способны к синтезу ИУК, а для 13 из них был проведен подтверждающий анализ методом ВЭЖХ-УФ. Максимальная обнаруженная концентрация ИУК составила 29,3 мг/г сухой массы у *Rhodosporidium paludigenum*.

Дрожжи, выделенные из почвы также способны к синтезу ИУК. Из 538 штаммов, выделенных из темно-каштановой почвы под бобовыми растениями, 77 (14,3%) оказались ИУК-производителями. Максимальная концентрация составила 51,7 мг/л у штамма *Aureobasidium pullulans* (Ignatova et al. 2015). Необходимо уточнить, что *Aureobasidium pullulans* является скорее типичным представителем эпифитной микрофлоры и его обнаружение в почве скорее всего связано с попаданием туда вместе с растительным опадом.

Дрожжи, выделенные из филлосферы и ризосферы росянки лопатчатой (*Drosera spatulata*) также проявляют способность к синтезу ИУК (Fu et al., 2016). Все 40 исследованных штаммов синтезировали ауксин и наибольшую активность проявляли штаммы *Aureobasidium pullulans* (до 610,63 мг/л с добавкой триптофана). Авторы отмечают штаммовую зависимость данного признака. Были также проведены тесты на влияние ИУК-активных штаммов на рост проростков табака (*Nicotiana benthamiana*). Для этого проростки помещались на агаризованную среду и по прошествии 2 недель в 3 сантиметрах от корней проростков помещалась биомасса дрожжей. Оказалось, что наиболее активные производители ИУК стимулировали рост боковых корней, корневых волосков, увеличение количества хлорофилла, удлинение стебля и увеличение числа листьев. Достоверного влияния на длину корня обнаружено не было.

Можно сказать, что на данный момент уже установлено, что дрожжи активно синтезируют ауксин. При этом не предпринято никаких попыток сравнить фитогормональную активность с филогенетическими или экологическими признаками штаммов. Также отсутствуют данные о способности дрожжей синтезировать цитокинины и гиббереллины.

1.5. Общие закономерности проявления фитогормональной активности

По итогам рассмотрения фитогормональной активности различных микроорганизмов, можно сделать несколько выводов, касающихся закономерностей проявления этого признака:

- 1) Показано, что многие микроорганизмы способны синтезировать соединения из всех трех основных групп гормонов-стимуляторов: ауксины, цитокинины и гиббереллины. Причем, представители одного рода и даже вида способны к синтезу сразу нескольких гормонов.
- 2) Способные к синтезу фитогормонов микроорганизмы способны стимулировать рост высших растений, что подтверждено большим количеством исследований.
- 3) Не подтверждена связь фитогормональной активности с патогенностью микроорганизмов или с их эпифитным (эндофитным) образом жизни.
- 4) Способность к синтезу фитогормонов отличается большой вариабельностью не только в пределах одного рода, но даже в пределах вида, т.е. имеет «штаммовую» зависимость.
- 5) Судя по всему для микроорганизмов характерно накопление фитогормонов в среде по типу вторичного метаболизма, когда максимум концентрации продукта приходится на стационарную фазу роста, а накопление продукта происходит линейно.

Это, пожалуй, самые общие выводы, которые можно получить из анализа литературы, все остальные обнаруженные факты, весьма вероятно, имеют частную природу и не могут быть всеобщими закономерностями.

Глава 2. Объекты и методы

2.1. Исследуемые штаммы и их культивирование

В качестве объекта исследования были использованы 147 штаммов дрожжей, относящиеся к 46 видам, большинство из которых было выделено из филлосферы, ризосферы, подстилки, почвы, энтомофильных цветков. Часть штаммов была выделена из таких субстратов, как ил, морская и пресная вода, водоросли (Приложение 1). Исследуемые штаммы находятся в коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения и были предоставлены сотрудниками кафедры для изучения фитогормональной активности.

Идентификация штаммов была проведена на основании нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов рДНК по описанным ранее методикам (Глушакова и др., 2015; Глушакова и др., 2016). Выделение штаммов проводили в 2009-2015 годах, штаммы хранили в 15% растворе глицерина при -20°C.

Перед началом исследований фитогормональной активности культуры размораживали и культивировали на глюкозо-пептоно-дрожжевом агаре (ГПДА) в чашках Петри, периодически пересевая для поддержания жизнеспособности.

Более трети изучаемых штаммов было выделено в Московской области. Также присутствуют штаммы, выделенные в Дагестане, Монголии, Бурятии и Брянской области. Широко представлены дрожжи выделенные в регионах с суровым климатом, в т.ч. арктическим и субарктическим – есть штаммы из Иркутской области, Красноярского края, Ханты-Мансийского автономного округа, Чукотки, о-ва Шпицберген, о-ва Диксон, Мурманской области, республики Коми и Беломорской биологической станции. Также присутствуют штаммы из Памира. Тропический регион представлен штаммами из Вьетнама, Марокко и с острова Борнео.

Для получения культуральной жидкости штаммы дрожжей в виде первоначального инокулята инкубировали во флаконах объемом 15мл с 10мл среды на шейкере в термостате при 20°C в течение 4 суток, затем переносили 100мкл наращенной культуры в микробиологические матрасы на 250 мл (Greiner) с 50 мл среды, и инкубировали при тех же условиях в течение 10 суток (Limtong, Koowadjanakul, 2012). Стадию предварительного наращивания использовали для внесения дрожжей в матрасы уже на экспоненциальной фазе роста. Данная продолжительность культивирования была подобрана экспериментально, с учетом, чтобы все исследуемые гормоны были в максимальной концентрации. Температура была выбрана средняя, с учетом, что для многих штаммов более низкие или более высокие значения были бы неприемлемы. Среду для культивирования дрожжей готовили из расчёта 6,7 г азотной основы (Fluka) и 5 г глюкозы на один литр воды (Kurtzman, Fell, 1998). После окончания культивирования культуральную жидкость, необходимую для анализа, переливали в центрифужные пробирки на 50 мл и отделяли от биомассы дрожжей центрифугированием в течение 10 мин при 11500g на центрифуге R 5810 (Eppendorf).

Биомассу использовали для расчета удельной концентрации ауксина, для этого ее взвешивали, предварительно перенося в доведенные до постоянной массы флаконы объемом 2 мл. Чтобы избежать потерь клеток при переносе биомассы, применяли следующую технику: к осадку клеток на дне центрифужных пробирок добавлялся 1 мл дистиллированной воды и пробирки помещались на вортекс-шейкер с амплитудой колебаний 3 мм на 5 мин при скорости 2000 об/мин. Затем взмученные клетки переносили пипеточным дозатором на 1 мл во флаконы объемом 2 мл и центрифугировали их в течение 10 мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf). Надосадочную жидкость убирали дозатором. Затем снова добавляли 1 мл воды в центрифужные пробирки на 50 мл и ставили на вортекс –шейкер на 5

мин. После снова переносили дозатором остатки клеток в те же флаконы и снова их центрифугировали и затем удаляли воду. Если в центрифужных пробирках оставались клетки все операции повторялись вновь. Флаконы с клетками после удаления всей надосадочной жидкости взвешивались на аналитических весах.

Биомасса некоторых штаммов была высушена в твердотельном термостате «Гермит» при 50⁰С в течение 3 суток и снова взвешена.

2.2. Исследуемые растительные гормоны

Для исследования были взяты самые широко распространенные в природе соединения из трех групп гормонов-стимуляторов: из ауксинов – 3-индолилуксусная кислота (ИУК или ауксин); из цитокининов – зеатин; из гиббереллинов – ГК₃.

2.3. Определение ауксина в культуральной жидкости дрожжей

Ауксин присутствует в культуральной жидкости дрожжей в гораздо больших концентрациях, чем зеатин и ГК₃, поэтому для его определения подходит сокращенная методика, использующая меньший объем матрицы, без применения очистки и с измерением концентрации ИУК при помощи УФ-детектора.

Пробоподготовка для определения ауксина: 20 мл культуральной жидкости подкисляли соляной кислотой до pH=3 и помещали в делительную воронку объемом 100мл, доливали в неё 20 мл этилацетата (Tien et al., 1979) и интенсивно встряхивали в течение 1 минуты. После этого водную фазу сливали и подвергали этой процедуре повторно, а органическую фазу

помещали в колбу для выпаривания объемом 100мл. Повторно проэкстрагированную водную фазу сливали, а новую порцию органической фазы выливали в ту же колбу. Затем воронку промывали 10 мл этилацетата, который также выливали в колбу. Экстракт концентрировали на роторном испарителе (50 об/мин) при 30°C (Lu et al., 2010) до конечного объема $\leq 0,5$ мл.

Полученный концентрат переносили в хроматографическую виалу объемом 1,5 мл, а в колбу для упаривания добавляли 0,5 мл ацетонитрила и помещали в ультразвуковую ванну на 1 мин для отделения ИУК от стенок колбы. Ацетонитрил из колбы также переносили в виалу, после чего ещё раз добавляли в колбу 0,5 мл ацетонитрила и повторяли обработку. При необходимости доводили содержимое виалы ацетонитрилом до 1,5 мл.

Количественное определение ИУК проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 series с УФ-детектором. Использовались предколонка Security Guard Catridges C18 4x3.0мм и аналитическая колонка ВЭЖХ Диасфер 110-C18 5мкм 4.0x250мм. Длина волны детектирования – 222 нм. Скорость потока элюента – 0,75мл/мин. Подвижная фаза– вода, ацетонитрил, 0,05% трифторуксусная кислота (45:54:1% об./об.). Объем вводимой пробы – 25мкл. Температура термостата колонок - 30°C. Анализ проводился в течение 15 минут.

Для калибровки прибора использовали растворы в ацетонитриле стандартного вещества 3-индолилуксусной кислоты фирмы ДиаМ. Калибровку проводили по четырем уровням. Отклонение от линейности не превышало 15% (рис. 8).

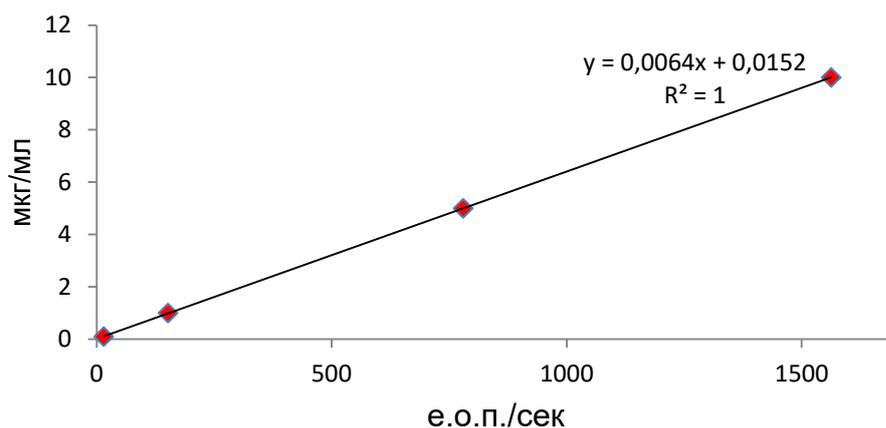


Рисунок 8. Калибровочная кривая для определения ИУК методом ВЭЖХ-УФ

Выход ауксина на уровне 50 мкг/л составил – 96%. Предел количественного определения ауксина - 5 мкг/л.

Типичные хроматограммы приведены в Приложении 4.

2.4. Совместное определение ауксина и гиббереллина в культуральной жидкости дрожжей

Для определения гиббереллиновой кислоты необходима сложная методика включающая очистку при помощи твердофазной экстракции и измерение на масс-спектрометре. Данная схема пробоподготовки подходит также для ауксина, поэтому возможно его параллельное определение.

Пробоподготовку проводили в три стадии. Культуральную жидкость предварительно подкисляли муравьиной кислотой до pH~3. Для этого в 50 мл культуральной жидкости вносили 500 мкл 10М муравьиной кислоты. Далее культуральную жидкость наносили на концентрирующий патрон C18 (Chromabond или J.T.Baker), предварительно подготовленный последовательным пропусканием 5 мл этанола и 5 мл воды. Пропускание проводили со скоростью 1 капля/сек. Прошедшую сквозь патрон культуральную жидкость отбрасывали и промывали патрон 5 мл воды.

Смывали фитогормоны 5 мл смеси этанол : вода : муравьиная кислота (80:20:0,5) в отгонную колбу объемом 25 мл (Han et al., 2011; Ma et al., 2008; Urbanova et al., 2013). Полученный экстракт концентрировали на роторном испарителе (50 об/мин) при 30°C (Lu et al., 2010) до конечного объема ~1,5мл, т.е. практически до полного отгона этанола.

Далее к остатку в отгонной колбе добавляли 3,5 мл 1М муравьиной кислоты и переносили в стеклянный флакон объемом 25 мл. Затем в этот флакон добавляли 5 мл этилацетата и интенсивно встряхивали в течение 5 мин на вортекс шейкере (3000 об./мин). После этого флакон оставляли на 5 минут до полного разделения фаз и отбирали органическую фазу в отгонную колбу на 25 мл. К водной фазе в стеклянном флаконе снова приливали 5 мл этилацетата и повторяли экстракцию на вортекс шейкере. Органическую фазу объединяли с первой порцией в отгонной колбе. Экстракт концентрировали на роторном испарителе (50 об/мин) при 40°C до конечного объема $\leq 0,5$ мл.

Полученный концентрат переносили в хроматографическую виалу объемом 1,5 мл, а в колбу для упаривания добавляли 0,5 мл ацетонитрила и помещали в ультразвуковую ванну на 1 мин для отделения гормонов от стенок колбы. Ацетонитрил из колбы также переносили в виалу, после чего ещё раз добавляли в колбу 0,5 мл ацетонитрила и повторяли обработку. При необходимости доводили содержимое виалы ацетонитрилом до 1,5 мл.

Количественное определение ИУК и гиббереллина проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 series с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS Agilent Technologies) (Giannarelli et al., 2009). Источник ионизации – электроспрей(-), колонка ВЭЖХ RP-8 3,5 мкм 4,6×200 мм. Подвижная фаза – муравьиная кислота 10 мМ и ацетонитрил. Объем вводимой пробы – 25 мкл. Температура термостата колонок – 30°C.

Градиентная таблица приведена ниже (таб. 2).

Таблица 2

Градиентная таблица для ВЭЖХ-МС/МС при измерении ауксина и ГК₃

Время, мин	Элюент (Б), %	Скорость потока элюента, мл/мин
0	40	1
1,5	50	1
2	60	1
2,5	100	0,2
10	100	0,2
10,5	100	1
12,5	40	1

Настройки ионного источника и масс-спектрометра:

- Мода (заряд измеряемого иона): отрицательная;
- m/z иона – прекурсора: ауксин - 174,06; гиббереллин - 345,14
- m/z дочернего иона: ауксин - 130,06; гиббереллин - 239,14
- Температура источника: 325⁰ С;
- Расход сушащего газа (азота): 7л/мин;
- Давление на распылителе: 20 psig;
- Напряжение на входном капилляре: -2500 V;
- Напряжение на фрагменторе: 175 V;
- Напряжение на скиммере: 65 V
- Энергия в ячейке соударения: ауксин - 10 eV, гиббереллин – 15 eV
- Скорость сбора данных: 1 спектр/сек.

Количественное определение ауксина и гиббереллина проводили по методу абсолютной калибровки посредством сравнения обилия (количества) дочерних ионов (m/z: ауксин = 130,06; гиббереллин = 239,14) в пробах и стандартных растворах фитогормонов: для ауксина 0,1048-10,48 мкг/мл (рис. 9); для гиббереллина 1,91 – 32,73 нг/мл (рис.10). Использовались стандартные вещества фирмы Acros

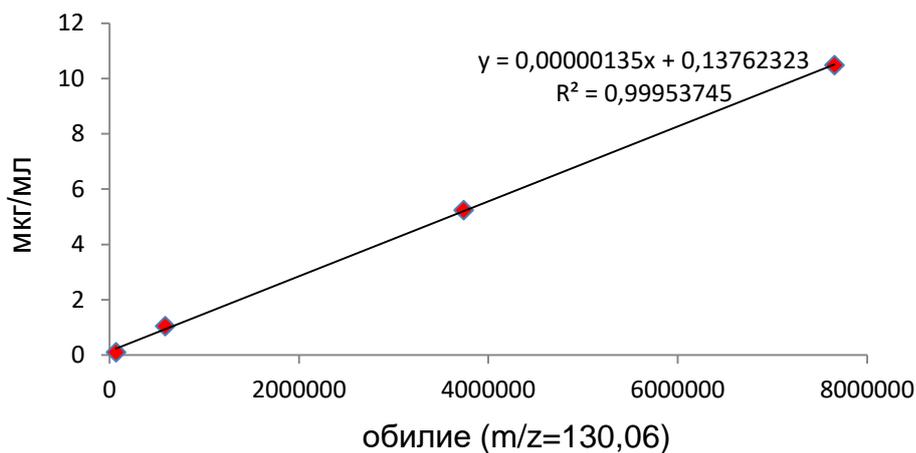


Рисунок 9. Калибровочная кривая для определения ИУК методом ВЭЖХ-МС/МС

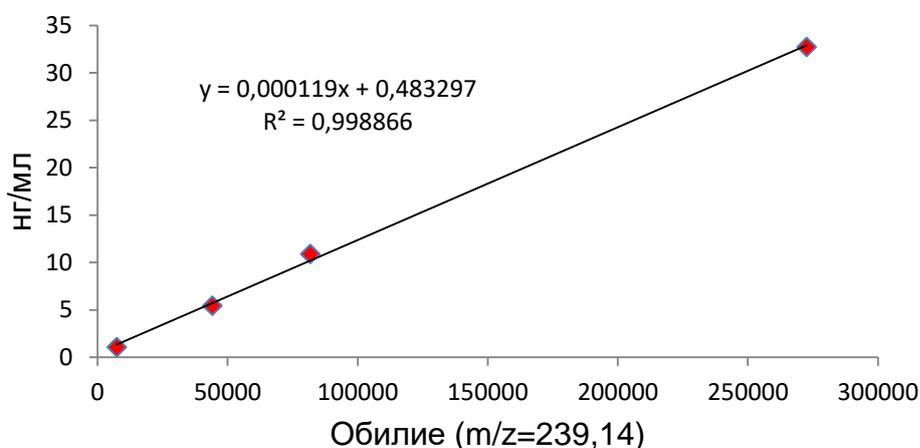


Рисунок 10. Калибровочная кривая для определения ГА₃ методом ВЭЖХ-МС/МС

Выход ауксина на уровне 200 мкг/л составил – 96%, выход гиббереллина на уровне 200 нг/л – 95%. Минимально детектируемое количество ауксина в культуральной жидкости – 0,6 мкг/л, гиббереллина – 6 нг/л. Предел количественного определения ауксина – 2 мкг/л, гиббереллина – 20 нг/л.

Типичные хроматограммы и масс-спектры приведены в Приложениях 6 и 7.

2.5. Определение зеатина в культуральной жидкости дрожжей

Пробоподготовку проводили в три стадии. Культуральную жидкость предварительно подкисляли муравьиной кислотой до pH~3. Для этого в 50 мл культуральной жидкости вносили 500 мкл 10М муравьиной кислоты. Далее 1 см³ катионита Dowex подготавливали последовательным пропусканием 5 мл метанола и 5 мл 1М муравьиной кислоты. Культуральную жидкость пропускали через катионит со скоростью 1 капля/сек. Прошедшую через катионит культуральную жидкость отбрасывали и промывали его 5 мл муравьиной кислоты. Далее смывали зеатин 6 мл 0,35М гидроксида аммония. Элюат нейтрализовывали 220 мкл 5М муравьиной кислоты. Далее нейтрализованный экстракт наносили на концентрирующий патрон C18 (Chromabond или J.T.Baker), предварительно подготовленный последовательным пропусканием 5 мл метанола и 5 мл воды. Пропускание проводили со скоростью 1 капля/сек. Прошедшую сквозь патрон культуральную жидкость отбрасывали и промывали патрон 5 мл воды. Смывали фитогормоны 6 мл метанола в отгонную колбу (Dobrev, Kaminek, 2001; Нойерова et al., 2006). Полученный экстракт концентрировали на роторном испарителе (50 об/мин) при 30°C (Lu et al., 2010) до конечного объёма ~0,5.

Полученный концентрат переносили в хроматографическую виалу объемом 1,5 мл, а в колбу для упаривания добавляли 0,5 мл ацетонитрила и помещали в ультразвуковую ванну на 1 мин для отделения ИУК от стенок колбы. Ацетонитрил из колбы также переносили в виалу, после чего ещё раз добавляли в колбу 0,5 мл ацетонитрила и повторяли обработку. При необходимости доводили содержимое виалы ацетонитрилом до 1,5 мл.

Количественное определение зеатина проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 series с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS Agilent Technologies) (Novak et al., 2008; Pan et

al., 2009). Источник ионизации – электроспрей(+), колонка ВЭЖХ RP-8 3,5 мкм 4,6×200 мм. Подвижная фаза – муравьиная кислота 10 мМ и ацетонитрил. Объем вводимой пробы – 25 мкл. Температура термостата колонок – 30°C.

Градиентная таблица приведена ниже (таб. 3).

Таблица 3

Градиентная таблица для ВЭЖХ-МС/МС при измерении зеатина

Время, мин	Элюент (Б), %	Скорость потока элюента, мл/мин
0	50	1
1,5	50	1
2	50	0,5
12	50	0,5
12,5	50	1
13	100	1
14	100	1
15,5	50	1

Настройки источника и масс-спектрометра:

- Мода (заряд измеряемого иона): положительная;
- m/z иона – прекурсора: зеатин:220,12;
- m/z дочернего иона: зеатин:136,06;
- Температура источника: 325⁰ С;
- Расход сушащего газа (азота): 5 л/мин;
- Давление на распылителе: 20 psig;
- Напряжение на входном капилляре: 2500 V;
- Напряжение на фрагменторе: 100 V;
- Напряжение на скиммере: 65 V
- Энергия в ячейке соударения: 15 eV
- Скорость сбора данных: 1 спектр/сек.

Количественное определение зеатина проводили по методу абсолютной калибровки посредством сравнения обилия (количества) дочернего иона (m/z : зеатин = 136,06) в пробах и стандартных растворах фитогормона 0,9075 – 30,25 нг/мл (рис. 11). Использовались стандартные вещества фирмы Agros.

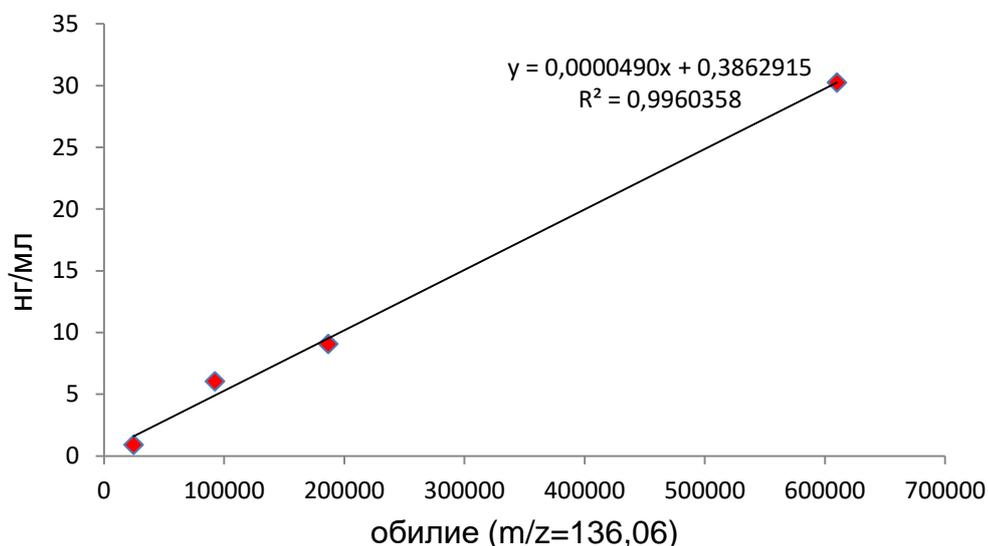


Рисунок 11. Калибровочная кривая для определения зеатина методом ВЭЖХ-МС/МС

Выход зеатина на уровне внесения 200 нг/л составил 95%, Минимально детектируемое количество зеатина в культуральной жидкости – 6 нг/л. Предел количественного определения зеатина - 20 нг/л.

Типичные хроматограммы и масс-спектры приведены в Приложении 8.

2.6. Изучение динамики накопления фитогормонов в культуральной жидкости дрожжей

В качестве объекта для данного исследования был выбран штамм № КБП У-6020 вида *Metschnikowia pulcherrima*, отличающийся высокой активностью по всем трем исследуемым фитогормонам. Условия роста и состав среды были такие же, как описано выше. В эксперименте было две

повторности по 13 микробиологических матрасов в каждой. Матрасы снимались каждые 6 часов первые 2 суток и далее ежесуточно вплоть до достижения срока в 10 суток. Снятые матрасы с культуральной жидкостью помещались в морозильную камеру и хранились до начала экстракции фитогормонов при -20°C .

После окончания эксперимента, была проведена экстракция и определение ИУК, зеатина и гиббереллина в культуральной жидкости, так как описано выше. Также была определена сырая биомасса клеток в соответствии с вышеописанной методикой. В итоге были построены кривые накопления фитогормонов в среде и кривая роста культуры.

2.7. Эксперименты по изучению стимуляции роста дрожжами проростков культурных растений

2.7.1. Влияние дрожжей на скорость прорастания пшеницы

Эффективность стимуляции определяли по выделению углекислоты (Федотов, Федотова, 2015; Федотов и др., 2016). Для этого семена (5 г) помещали в стаканчики объемом 100 мл, засыпали 20 г отмытого сухого песка и добавляли по 5 мл испытуемых препаратов или стерильной воды. Количество дрожжей в препаратах $2-4 \times 10^7$ КОЕ/мл, содержание автолизата 75 мг/мл. После этого стаканчики помещали в герметично закрытые емкости объемом 3 литра и инкубировали при температуре 25°C в течение 24 ч. Эффект оценивали как прибавку количества выделившегося CO_2 по отношению к стерильной воде. Опыты проводили в семикратной повторности. Ошибка не превышала 5%. Концентрацию CO_2 определяли с помощью газоанализатора “Testo 535” в диапазоне 0–9999 ppm. Выбранная методика позволяет одновременно исследовать от 1000 до 1500 семян, что

сокращает величину ошибки, связанную с разнокачественностью семян. Обработку семян препаратами дрожжей осуществляли полусухим способом при расходе растворов 20 мл на килограмм семян.

2.7.2. Влияние культуральной жидкости дрожжей на рост проростков *Lepidium sativum*

В качестве объекта исследования были выбраны штаммы, оказавшиеся наиболее представительными, т.е. показавшие максимальную или минимальную активность в производстве фитогормонов. Для проведения лабораторного эксперимента с культуральной жидкостью мы выбрали кресс-салат (*Lepidium sativum*). Это мелкосеменной вид и наилучшим образом подходит для биологических тестов по изучению влияния фитогормонов (Якушкина, Бахтенко, 2005). Также нами были проведены пробные эксперименты с пшеницей и редисом, но максимально достоверные отличия были получены на кресс салате. Эксперимент проводили в чашках Петри (d=9см.), семена раскладывали по 10 штук на фильтровальную бумагу, смоченную культуральной жидкостью разведенной в минеральной смеси Кнопа (Журбицкий, 1968; Минеев и др., 2001). Эксперимент проводили в 5 повторностях. Разведения были от 1/1000 до 1/1000000, при более низких разведениях наблюдалось практически полное ингибирование роста проростков. В качестве контроля использовалась смесь Кнопа без добавки культуральной жидкости. Чашки с семенами помещались в термостат на трое суток при температуре 25⁰С, после чего проводилось измерение длины корешков и стеблей миллиметровой линейкой (Loper, Schroth, 1986). После этого проростки помещались в доведенные до постоянной массы бюксы (по вариантам эксперимента) и высушивались при 50⁰С в вакуумном шкафу в течение 3 суток. После этого бюксы взвешивались на аналитических весах.

2.8. Дополнительные тесты

2.8.1. Микроаэрофильный тест

Было проведено исследование способности штаммов № КБП Y-6020 *Metschnikowia pulcherrima* и № КБП Y-5132 *Pseudozyma hubeiensis* сохранять фитогормональную активность в условиях нехватки кислорода, которая обычно наблюдается внутри тканей растений при эндофитном образе жизни дрожжей. Для этого нагретую до 90⁰С жидкую среду, состав которой описан выше, разливали в 50 мл центрифужные пробирки доверху и плотно закрывали крышку. Дав остыть, вносили наращенную культуру и снова плотно завинчивали крышку. Эксперимент в недостатке кислорода проводился 10 суток при 20⁰С. Экстракция фитогормонов и определение сырой массы дрожжей проводились стандартно.

2.8.2. Тест при повышенной температуре

Для проведения экспериментов штаммы № КБП Y-6020 *Metschnikowia pulcherrima* и № КБП Y-5132 *Pseudozyma hubeiensis* выращивали на стандартной среде и в матрацах, но при температуре 25⁰С. Продолжительность эксперимента составила 10 суток. Экстракция фитогормонов и определение сырой массы дрожжей проводились стандартно. В эксперименте использовались те же штаммы, что и при микроаэрофильном тесте.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Разработка и адаптация методик по определению фитогормонов в культуральной жидкости

Наша работа была начата с разработки аналитических методов, позволяющих определять микроколичества биологически активных веществ в культуральной жидкости микроорганизмов. Здесь перед нами встают три вопроса:

- 1) Какое детектирование необходимо для определения ауксина, зеатина и гиббереллиновой кислоты?
- 2) Во сколько раз мы должны сконцентрировать пробу?
- 3) Необходима ли очистка культуральной жидкости?

Для определения ИУК было решено использовать ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектором, длина волны 222 нм (Tien, 1979). Количественное определение при этом начиналось в образцах стандартов с уровня 0,1 мкг/мл. Экстрагировать было решено в системе этилацетат:вода (Tien, 1979). Для анализа использовалось 20 мл культуральной жидкости. Конечный объем экстракта после концентрирования – 1,5 мл, итого концентрирование в 13 раз. Предел обнаружения порядка 0,5-1 мкг/г сырой биомассы. Для сравнения, фотометрический метод, используемый в работах по ауксиногенной активности дрожжей, обеспечивает надежное определение начиная с уровня >2000 мкг/г (Glickmann, Dessaux, 1995). Метод ВЭЖХ обеспечивает надежную идентификацию ауксина, тогда как реактив Сальковского, используемый в фотометрии, реагирует с другими индолами (Glickmann, Dessaux, 1995). Типичные хроматограммы приведены в Приложении 4. Благодаря использованию ВЭЖХ-УФ мы смогли определить намного более низкие концентрации ауксина, чем другие исследователи (Nassar et al., 2004; El-Tarabily, 2006; Xin et al., 2009; Limtong, Koowadjanakul, 2012; Limtong et al., 2014; Nutaratat et al., 2014; Ignatova et. al., 2015; Fu et. al.,

2016), с чем вероятно, связано то, что нам удалось показать высокую частоту распространения ауксиногенной активности.

С определением зеатина дело обстоит несколько сложнее, во-первых, он присутствует в культуральной жидкости в наноколичествах, а во-вторых, имеет довольно слабое поглощение при длине волны 254 нм, использованной в работе по определению гормонов в культуральной жидкости некоторых бактерий (Karadeniz et al., 2006), приблизительно на два порядка меньше, чем ИУК. Хотя на 254 нм определения вести удобнее, т.к. мешающих соединений меньше, чем при длине волны 222 нм, как в случае ауксина.

Мы сделали попытку максимально сконцентрировать пробы культуральной жидкости, для этого применили лиофилизацию (Hussain, Hasnain, 2009) т.к. обычная жидкостная экстракция была неудобна вследствие необходимости использовать пробы объемом 500 мл и более. Далее из лиофилизированного осадка провели экстракцию этилацетатом (рН~8). Соответственно, пробу удалось сконцентрировать в более чем 60 раз. В Приложении 5 приведена типичная хроматограмма, на которой виден пик зеатина. Но вследствие его малой площади и возможного наложения пиков примесей, мы не можем провести количественное определение. Нами была предпринята попытка провести выделение зеатина из культуральной жидкости методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах типа C18, с последующей реэкстракцией органическим растворителем, но, как выяснилось, нецелевые соединения резко снижают емкость патрона и мы можем без потерь целевого вещества пропустить через патрон не более 10 мл культуральной жидкости. В любом случае, определение зеатина методом ВЭЖХ-УФ оказалось сложным и не эффективным – достигнут предел количественного определения ~1500 нг зеатина на грамм сырой биомассы, в то время как в культуральной жидкости дрожжей зеатин содержится в меньших концентрациях (до 900 нг/г, см. Приложение 2).

Руководствуясь известными закономерностями распространения фитогормонов в природе (Юсуфов, 1996), можно предположить, что гиббереллин будет содержать в меньших концентрациях, чем зеатин. При помощи ВЭЖХ-УФ его определяют при длине волны 208 нм (Karadeniz et al., 2006). Однако, поглощение аналита на этой длине волны слабое, в то время как большинство примесей, присутствующих в растворе поглощают очень эффективно, создавая интенсивный фон.

Для определения зеатина и ГК₃ лучше всего подходят методы масс-спектрометрии в сочетании с ВЭЖХ. (Giannarelli et al, 2010). По нашим данным (см. «Объекты и методы») мы можем определять эти фитогормоны начиная с концентрации в пробе 1 нг/мл. Но даже в этом случае необходимо дополнительное концентрирование реальной пробы и последующая ее очистка, т.к. концентрированная культуральная жидкость представляет собой взвесь, содержащую белки, сахара, липиды и множество низкомолекулярных соединений.

Для надежного определения фитогормонов мы решили использовать не менее 50 мл культуральной жидкости. Для пробоподготовки использовался метод ТФЭ (твердофазной экстракции), позволяющий избежать использования больших объемов растворителей, значительных потерь анализируемых соединений, а также обеспечивающий высокую степень очистки. Ориентируясь на имеющиеся в литературе сведения (Ma et al., 2008; Nan et al., 2011; Urbanova et al., 2013) по определению фитогормонов в растениях, мы установили, что нам необходима двухстадийная пробоподготовка с применением ионообменных смол (Oasis-MCX, Oasis-MAX, DEAE Sephadex и Oasis HLB) и концентрирующих патронов на основе силикагеля с привитыми углеродными цепями (C18).

Нами были использованы традиционные ионообменные смолы типа Dowex и Amberlite на основе сополимеров стирола и дивинилбензола, менее дорогие и как следствие более доступные. Как оказалось, после пропускания

культуральной жидкости через катионит Dowex 50W×8, экстракт можно дополнительно очистить на патроне C18 без потерь зеатина. Типичные хроматограммы приведены в Приложении 7. Прошедшую только одну стадию очистки пробу оказалось затруднительно вводить в хроматограф, т.к. она не была достаточно очищена и зеатин с трудом отделялся от соединений со схожей молекулярной массой при малых концентрациях.

Данная схема оказалась неприменима для гиббереллиновой кислоты, т.к. гидрофобные взаимодействия прочно удерживали вещество на анионите Amberlite IRA-400 и не позволяли полностью его смыть кислотой. Но, как следствие, ГК₃ прочно удерживается на патроне C18, закрепляясь быстрее посторонних соединений, при этом потом легко смываясь смесью этанола, воды и муравьиной кислоты (80:20:0,5 об./об.). Эта схема применяется при анализе гормонов в молоке кокосов (Ma et al., 2008). Однако, одностадийная очистка оказалась недостаточной – как и в случае зеатина, соединения со схожей молекулярной структурой мешали определению гормонов с помощью масс-селективного детектора.

Дополнительную очистку на анионите мы не могли использовать и поэтому заменили ее микроэкстракцией этилацетатом, позволившей добиться нужной чистоты. Для ее проведения мы отгоняли концентрат на роторном испарителе при 40⁰С до полного улетучивания спирта, доводили объем экстракта до 5 мл при помощи 1М муравьиной кислоты и экстрагировали двукратно 5 мл этилацетата встряхиванием на вортекс-шейкере в течение 5 мин. Таким образом, мы заменили ручное встряхивание автоматическим, тем самым добиваясь лучшей воспроизводимости. Типичные хроматограммы и масс-спектры приведены в Приложении 8

В итоге мы получили универсальную схему пробоподготовки культуральной жидкости, учитывающую все нюансы, для определения фитогормонов – стимуляторов роста (рис. 12). Данная пробоподготовка подходит для культуральной жидкости любых микроорганизмов. Подробно

сами методики, условия хроматографирования, настройки масс-спектрометра и метрологические характеристики описаны в разделе «Объекты и методы».

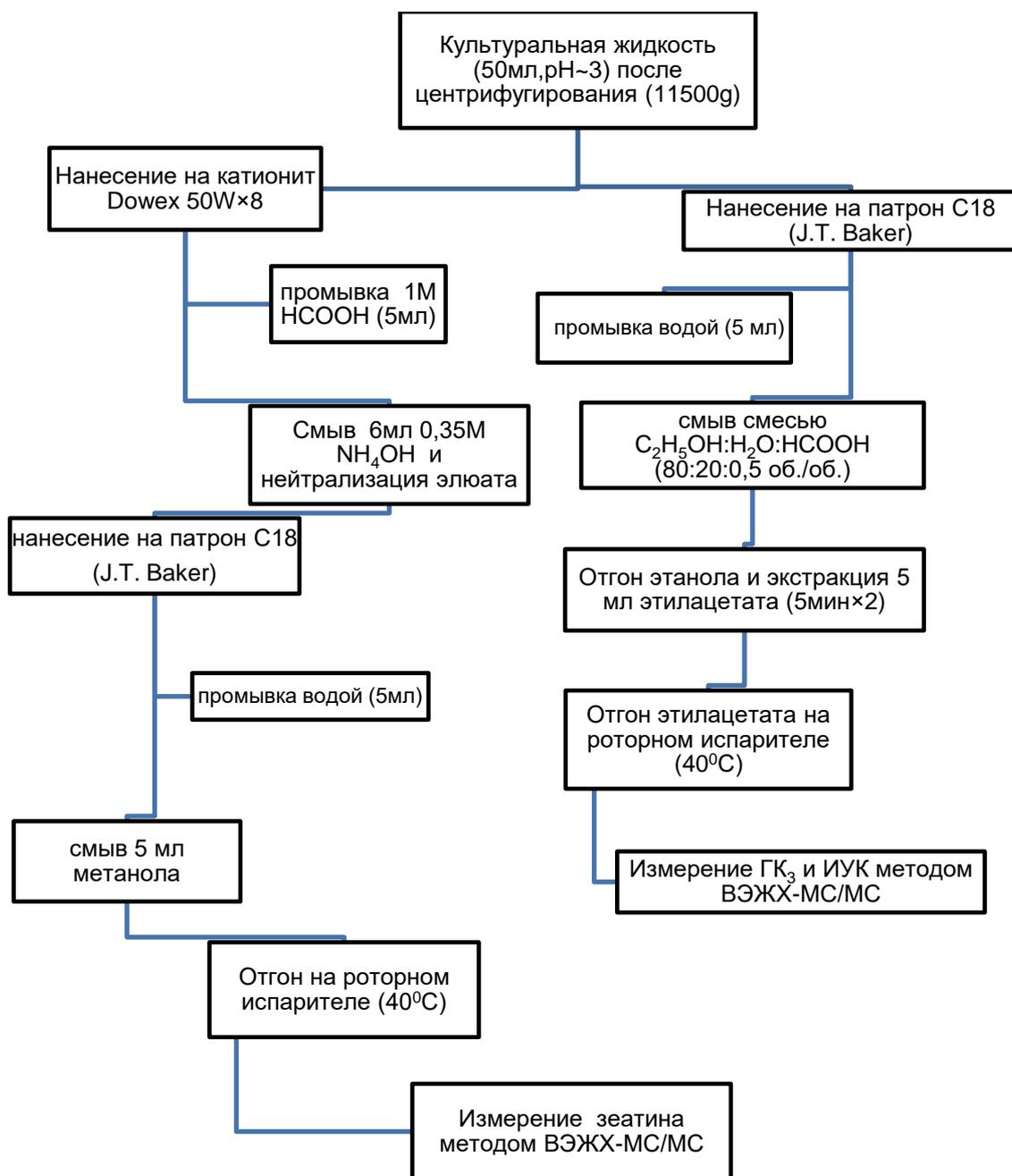


Рисунок 12. Универсальная схема пробоподготовки культуральной жидкости микроорганизмов для определения 3-индолилуксусной кислоты, зеатин и гиббереллиновой кислоты методом ВЭЖХ.

3.2. Стабильность фитогормональной активности

В первую очередь нами были проверено, как на фитогормональную активность дрожжей влияет количество пересевов дрожжей на твердых средах и, соответственно, возраст культур. Для проверки способности дрожжей поддерживать фитогормональную активность были взяты два штамма: КБП У-5623 *Metschnikowia pulcherrima* – аскомицет и КБП У-5472 *Sporobolomyces roseus* – базидиомицет. Культуры пересевали на ГПДА еженедельно в течение 3 месяцев (август-октябрь 2015 года) и после каждого посева проверяли уровень фитогормональной активности (рис. 13). Можно видеть, что с количеством пересевов и временем концентрации фитогормонов практически не меняются, колебания не превышают 15% и сопоставимы с аналитической ошибкой, т.е. можно утверждать, что данное свойство у дрожжей стабильно и продолжительность исследований, связанное с длительным поддержанием жизнеспособных культур, не является существенным фактором при рассмотрении фитогормональной активности.

Стабильность фитогормональной активности также важна с позиции определения природы дрожжевых фитогормонов. Для типичных вторичных метаболитов, таких как антибиотики характерно постепенное падение активности с возрастом культуры продуцента. Отсутствие этой особенности у дрожжей – признак, что синтез фитогормонов входит в основной метаболизм.

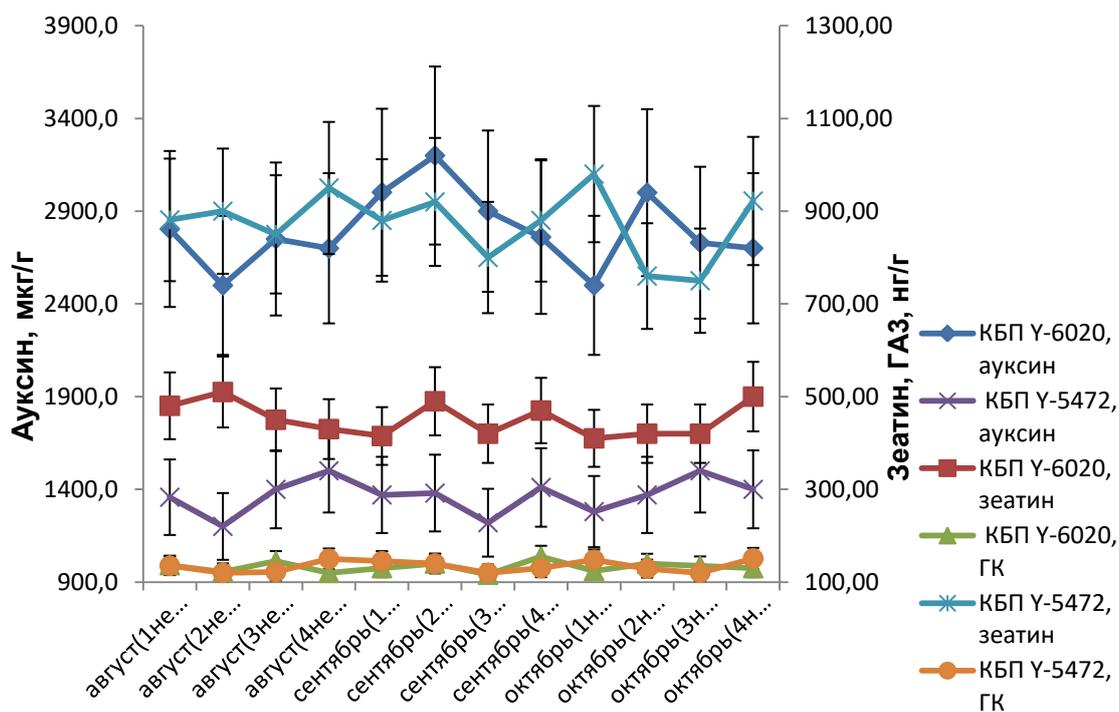


Рисунок 13. Изменение фитогормональной активности дрожжей в зависимости от времени и частоты пересевов культуры.

3.3. Скрининг штаммов дрожжей на присутствие фитогормонов в культуральной жидкости

Всего было исследовано 137 штаммов на присутствие 3-индолуксусной кислоты в культуральной жидкости, 76 штаммов на присутствие зеатина и 50 штаммов на присутствие гиббереллиновой кислоты (Приложение 2). 93% исследованных штаммов способны к синтезу ИУК, из них доля активных аскомицетов 88%, базидиомицетов - 95%. К синтезу зеатина способны 55% исследованных штаммов, из них аскомицетов 35 % активных, среди базидиомицетов - 65%. Гиббереллин синтезируют 40% исследованных штаммов, из базидиомицетов активны 36%, из аскомицетов 44% (рис. 14). Таким образом, существенная разница по частоте встречаемости фитогормональной активности между отделами наблюдается только для зеатина, среди базидиомицетов способность к его синтезу обнаруживается в 2 раза чаще. В целом, среди дрожжей частота встречаемости

фитогормональной активности падает в ряду ауксин – зеатин – гиббереллин, что соответствует общим представлениям о распространенности этих фитогормонов в природе (Юсуфов, 1996).

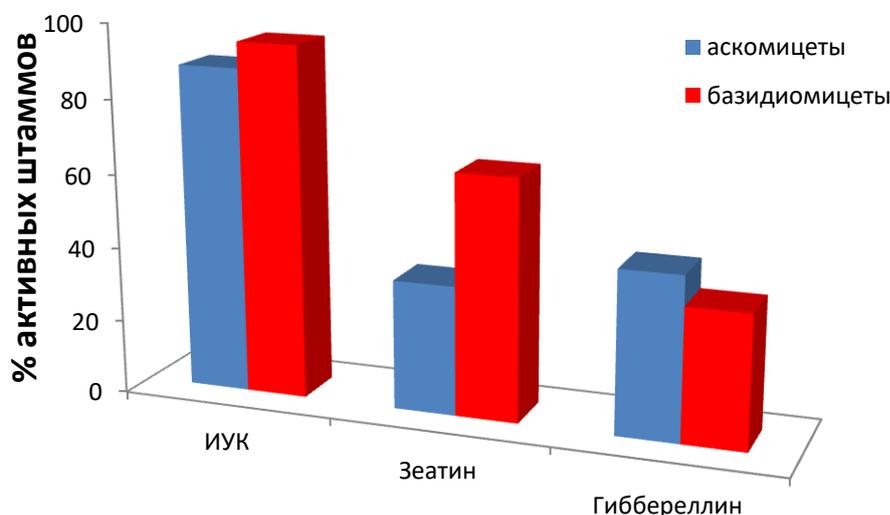


Рисунок 14. Доля исследованных дрожжей, способных к синтезу фитогормонов

Все исследованные штаммы, способные к синтезу зеатина, способны синтезировать также ИУК, исключение составляет 1 штамм *Rhodotorula mucilaginosa*. Также способны к синтезу ауксина все штаммы, синтезирующие ГК₃.

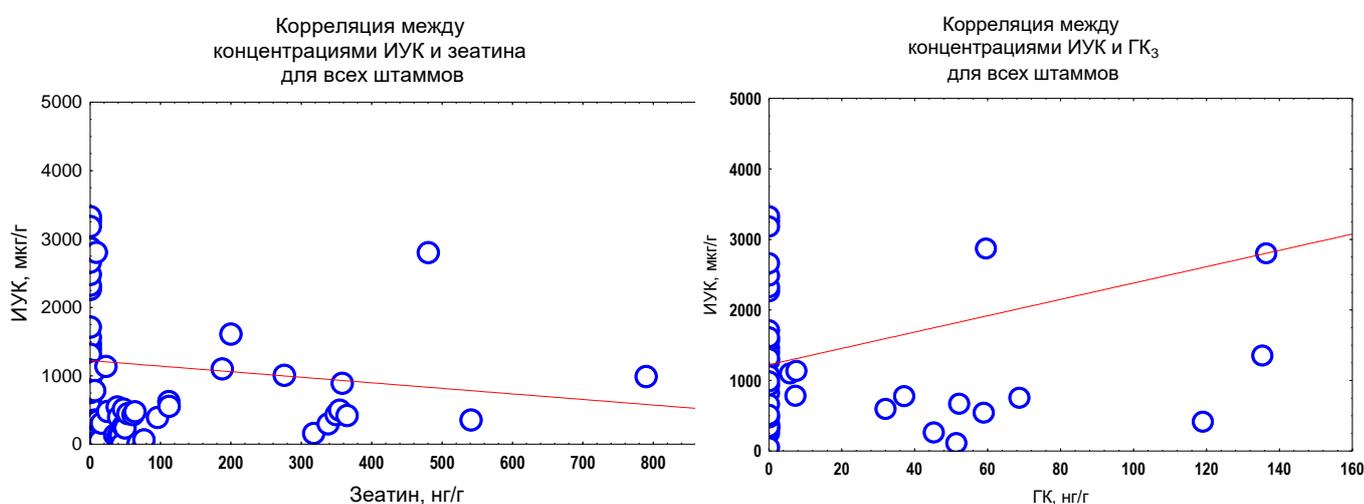
Среди обсуждаемых дрожжей 8 штаммов способны к синтезу всех трех гормонов сразу, что составляет 16% от общего числа исследованных. Среди них *Aureobasidium pullulans*, два штамма которого из трех представленных в данной работе, проявляют активность по ИУК, зеатину и ГК₃. Данный вид относится к черным аскомицетовым дрожжам, и, по сути, представляет особую группу эпифитов, которая будет рассмотрена позднее. Еще два штамма представлены видом *Sporobolomyces carnicolor*, отличающимся способностью к формированию баллистоспор и каротиноидной пигментацией, указывающими на эпифитный образ жизни (last, Price, 1969; Чернов, Марфенина, 2010).

Три из четырех рассмотренных представителей рода *Taphrina* также активно синтезируют все 3 исследуемых гормона. Мицелиальные

представители данного рода относятся к паразитам растений, а исследуемые дрожжи представляют анаморфную гаплоидную фазу развития, ведущую сапротрофный образ жизни (Inácio et al., 2004).

Последний из обсуждаемых штаммов относится к виду *Metschnikowia pulcherrima*, представители этого рода обычные обитатели сахаристых субстратов, таких как нектар и гниющие плоды.

Некоторыми авторами, работы которых рассмотрены в литературном обзоре, отмечалось, что у микроорганизмов, в частности мицелиальных грибов, активность по различным гормонам может коррелировать между собой. Оценка фитогормональной активности дрожжей по данному показателю, не обнаруживает подобных закономерностей, как среди всех видов, так и внутри одного вида (*Rhodotorula mucilaginosa*) (рис 15). Это означает, что синтез этих соединений не связан между собой.



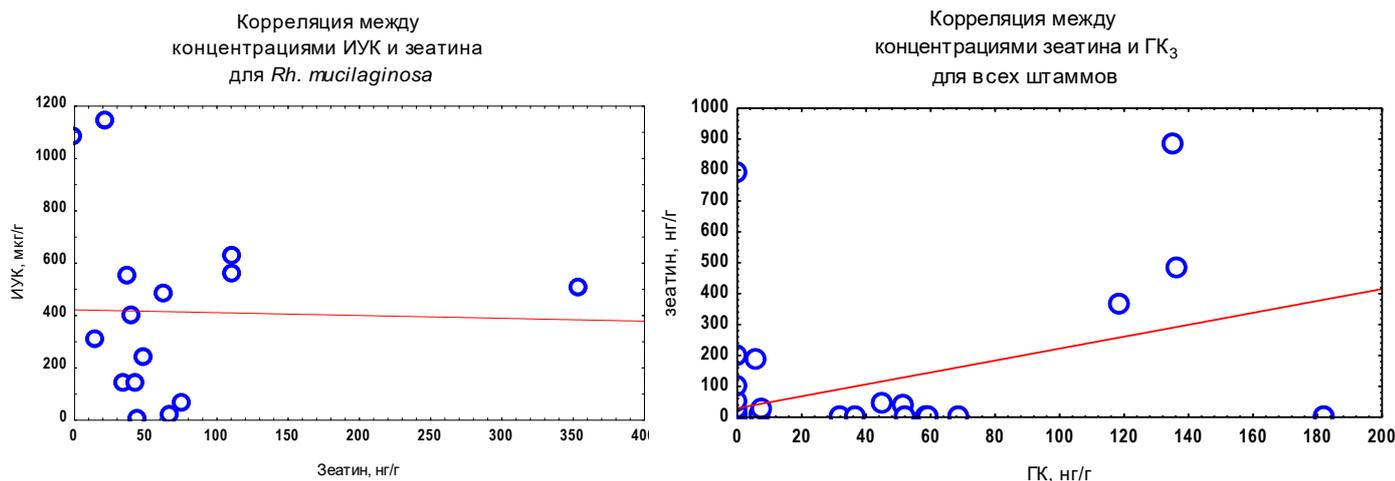


Рисунок 15. Корреляции между концентрациями гормонов для исследованных штаммов дрожжей ($r^2 < 0,3$)

Средняя продукция ауксина дрожжами исследованной выборки составила 605,6 мкг/г. Наибольшие значения концентрации ИУК в культуральной жидкости были обнаружены у штаммов *Metschnikowia pulcherrima* (КБП У-5623) – 7990,4 мкг/г, *Saccharomyces cerevisiae* (КБП У-4511) – 5060,6 мкг/г сырой биомассы, что в пересчете на сухую клеточную массу составляет 60,9 и 40,6 мг/г, соответственно, а в пересчете на объем культуральной жидкости соответственно 53269 и 33737 мкг/л. Данные виды относятся к аскомицетам и являются типичными обитателями сахаристых субстратов, таких как сладкие плоды, сокотечения деревьев и нектар. Можно констатировать, что дрожжи практически столь же активны в производстве ИУК, как и бактерии и мицелиальные грибы. Учитывая широкое распространение ауксиновой активности среди дрожжей, допустимо предполагать, что они способны оказывать не меньшее влияние на рост высших растений, чем другие микроорганизмы.

Полученные результаты соответствуют литературным данным о фитогормональной активности дрожжей, выделенных с поверхности и из тканей листьев риса и сахарного тростника в Таиланде и с тополя в США, где среди дрожжевого сообщества максимальные значения продукции были обнаружены у штаммов *Rhodosporidium paludigenum* (DMKU-RP301) – 29,3

мг/г, *Rhodosporidium babjevae* (WP1) – около 40,0 мг/г и *Rhodosporidium fluviale* (DMKU-RK253) – 74,4 мг/г сухой биомассы (Xin et al., 2009; Limtong et al., 2014; Nutaratat et al., 2014). Сравнение с данными других авторов осложнено тем, что в их исследованиях синтетическая активность дрожжей рассчитывалась не на единицу биомассы, а на объем культуральной жидкости. Так, среди дрожжевых грибов, выделенных из почвы в Казахстане, наибольшая продукция была обнаружена у штамма *Aureobasidium pullulans* (YA05) – 51,7 мг/мл (Ignatova et al., 2015), среди штаммов из болотных почв Тайланда – у *Rhodotorula mucilaginosa* (DMKU-Y33-A) – 66,9 мкг/мл (Jaiboon et al., 2016), а среди тропических штаммов из филлопланы – у *Candida maltosa* (LM114) – 314,3 мкг/мл (Limtong, Koowadjanakul, 2012). Эти авторы так же отметили, что ауксигенная продуктивность *Candida maltosa* (штамм LM114) была более высокой, чем у мицелиальных грибов и бактерий.

Среди дрожжевых грибов, выделенных с сахарного тростника, способность синтезировать ауксин была обнаружена у штаммов видов *Papiliotrema flavescens* (бывш. *Cryptococcus flavescens*), *Papiliotrema laurentii* (бывш. *Cryptococcus laurentii*), *Sporidiobolus ruineniae* (Limtong et al., 2014), которые рассматривались также в нашем исследовании. Согласно нашим данным, продукция ауксина штаммами этих видов составляет 1,75-5,10 мг/г сухой биомассы. Отметим также, что с поверхности сахарного тростника в Таиланде также был выделен штамм вида *Rhodotorula mucilaginosa*, в культуральной жидкости которого ауксин обнаружен не был, в отличие от большинства исследованных нами штаммов и штаммов, выделенных из темно-каштановой и болотной почв (Ignatova et al., 2015; Jaiboon et al., 2016).

Полученные результаты показали, что способность к синтезу ауксина у штаммов одного вида значительно различается, демонстрируя ярко выраженную штаммовую зависимость этого признака. Например, для вида *Rhodotorula mucilaginosa*, представленного в настоящем исследовании 31

штаммом, разброс концентраций ауксина в культуральной жидкости составил от 12,2 до 1139,1 мкг/г.

Средняя продукция зеатина дрожжами составила 88,5 нг/г влажной массы. Максимальные значения зафиксированы у штаммов 328v и КБП У-5472 вида *Sporobolomyces roseus*, 789,7 и 881,21 нг/г влажной биомассы, что соответствует 7900 и 8850 нг/г сухой клеточной биомассы соответственно или 5264,7 и 5874,7 нг/л культуральной жидкости. *Sporobolomyces roseus* относится к баллистоспоровым видам, зачастую встречающимся на поверхности растений. Можно констатировать, что уровень продуктивности по зеатину отличается на 3 порядка от ауксина в меньшую сторону. Это вполне ожидаемое различие, обычно наблюдаемое среди других микроорганизмов. Что касается сравнения уровня зеатиновой активности дрожжей с бактериями и мицелиальными грибами, то оно затруднено тем, что цитокинины это целая группа соединений и сравнивать зачастую приходится разные вещества. К тому же определять цитокинины намного сложнее и данных, полученных при помощи хроматографии, по ним намного меньше чем для ауксинов. Но, судя по имеющейся информации из литературного обзора, по способности синтеза зеатина дрожжи сопоставимы по средним значениям активности с бактериями, хотя и не могут считаться высокопродуктивными продуцентами.

Также как и в случае с ауксином, показано, что способность к синтезу зеатина у штаммов одного вида значительно различается, демонстрируя ярко выраженную штаммовую зависимость этого признака. Для вида *Rhodotorula mucilaginosa*, 15 штаммов которого были оценены по способности синтезировать зеатин, разброс концентраций зеатина в культуральной жидкости составил от 16,2 до 354,68 нг/г.

Средняя продукция гиббереллиновой кислоты дрожжами составила 29,5 нг/г влажной биомассы. Максимальные значения зафиксированы у штаммов КБП У-5623 и КБП У-6020 вида *Metschnikowia pulcherrima*, 182,3 и

136,4 нг/г влажной биомассы, что соответствует 1215,3 и 909,5 нг/г сухой клеточной биомассы, соответственно или 1840,2 и 1345,3 нг/л культуральной жидкости. Штамм КБП У-5623 также является рекордсменом по производству ИУК среди обсуждаемой выборки. *Metschnikowia pulcherrima* относится к аскомицетам и является типичным обитателем сахаристых субстратов, таких как сладкие плоды, сокотечения деревьев и нектар. Уровень гиббереллиновой активности в несколько раз ниже активности синтеза зеатина, т.е. по интенсивности синтеза гормонов дрожжами мы наблюдаем ряд ауксин – зеатин – гиббереллиновая кислота. Дрожжи значительно уступают некоторым мицелиальным грибам по способности к синтезу гиббереллина, которые способны доводить концентрацию ГК до нескольких миллиграмм в литре среды. Бактерии также намного активнее дрожжей – до сотен микрограмм в литре.

Тем не менее, более низкие концентрации гиббереллина не умаляют значения данного свойства у дрожжей, поскольку, например, как показано в литературном обзоре, эндофитные грибы обладают схожей с дрожжами активностью, хотя при этом способны стимулировать рост растений.

Данных о способности дрожжей синтезировать гиббереллины в литературе не было обнаружено, соответственно, наши результаты получены впервые.

Можно сделать итоговый вывод, что фитогормональная активность по ИУК, зеатину и ГК₃ среди дрожжей широко распространена, имеет штаммовую зависимость и колеблется в широких пределах. Способность к синтезу ауксина и гиббереллина распространена одинаково среди аскомицетов и базидиомицетов, а вот зеатин с большей частотой синтезируется базидиомицетовыми дрожжами. Для дальнейшего более подробного анализа факторов связанных с фитогормональной активностью мы переходим к следующей главе.

3.4. Сравнение фитогормональной активности дрожжей разных филогенетических групп

Анализ исследования факторов, влияющих на фитогормональную активность, предлагается начать с филогенетической зависимости, как самого фундаментального и общепризнанного показателя. Дрожжи в работе представлены двумя уже упомянутыми отделами, каждый из которых разбивается на несколько подотделов. Отдел *Ascomycota* включает подотделы *Peizizomycotina*, *Saccharomycotina* и *Taphrinomycotina*, а отдел *Basidiomycota* - *Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina* и *Ustilaginomycotina*.

Аскомицетовые дрожжи активнее синтезируют ауксин (рис. 16).

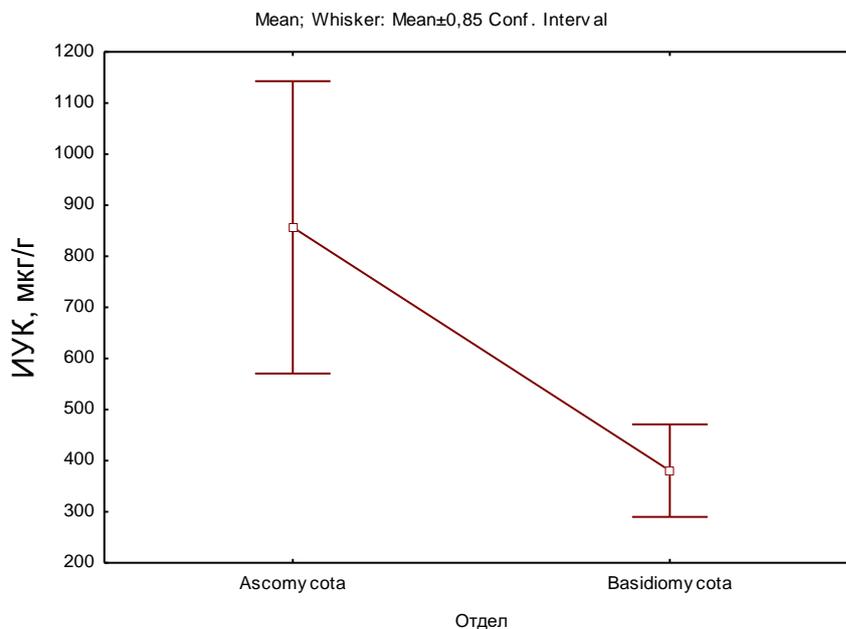


Рисунок 16. Интенсивность синтеза ауксина аскомицетовыми и базидиомицетовыми дрожжами

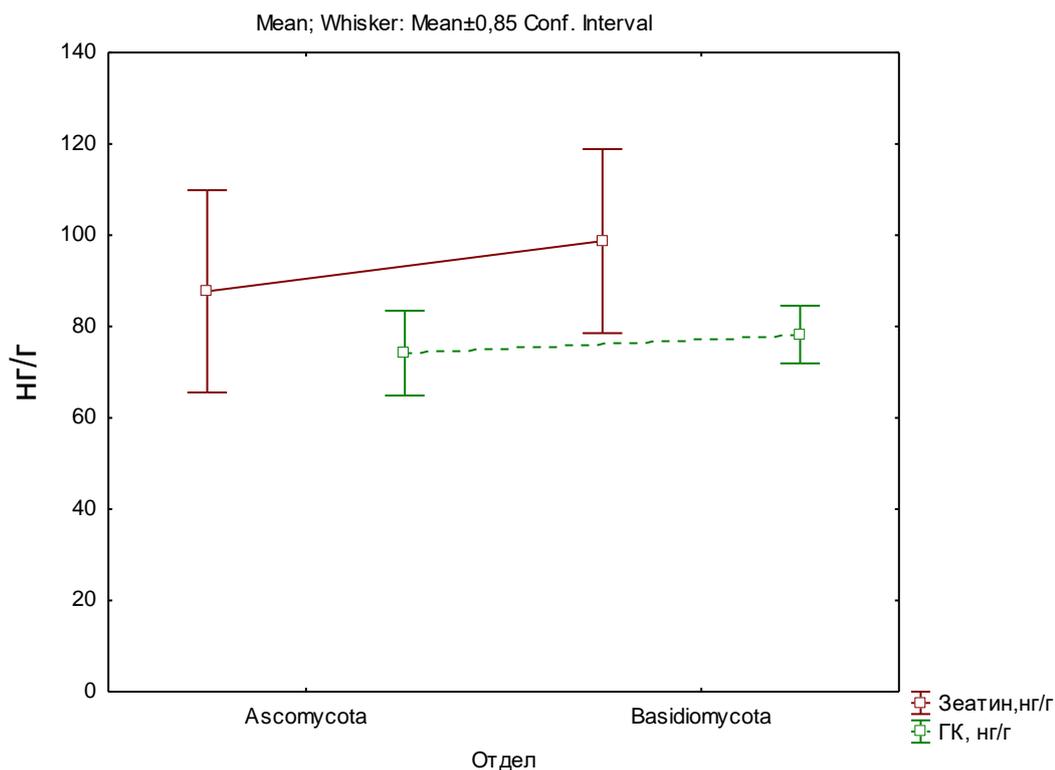


Рисунок 17. Интенсивность синтеза зеатина и ГК₃ актиномицетовыми и базидиомицетовыми дрожжами

По интенсивности синтеза зеатина и ГК₃ дрожжи разных отделов практически не отличаются (рис. 17).

Исследованные представители подотделов аскомицетов (*Saccharomycotina* и *Pezizomycotina*) не отличались по средней ауксиногенной активности (рис. 18). Среди базидиомицетов наиболее активно образовывали ИУК дрожжи из подотдела *Ustilaginomycotina*, представленные в исследовании родом *Pseudozyma*, их фитогормональная активность составляла 450-1317 мкг/г. Стоит отметить, что многие дрожжевые представители *Ustilaginomycotina* тесно ассоциированы с растениями, являясь анаморфными филогенетическими линиями среди телеоморфных фитопатогенов (Begerow et al., 2014). Исследованные представители базидиомицетов других подотделов – *Agaricomycotina* и *Pucciniomycotina*, были в среднем в два раза менее активны, чем штаммы из *Ustilaginomycotina*.

По синтезу зеатина все подотделы аскомицетовых и базидимицетовых дрожжей оказались приблизительно равны, за исключением подотдела *Taphrinomycotina*, представленного в работе родом *Taphrina* (рис. 19). Все мицелиальные представители данного рода относятся к паразитам растений, а исследуемые дрожжи представляют анаморфную гаплоидную фазу развития, ведущую сапротрофный образ жизни.

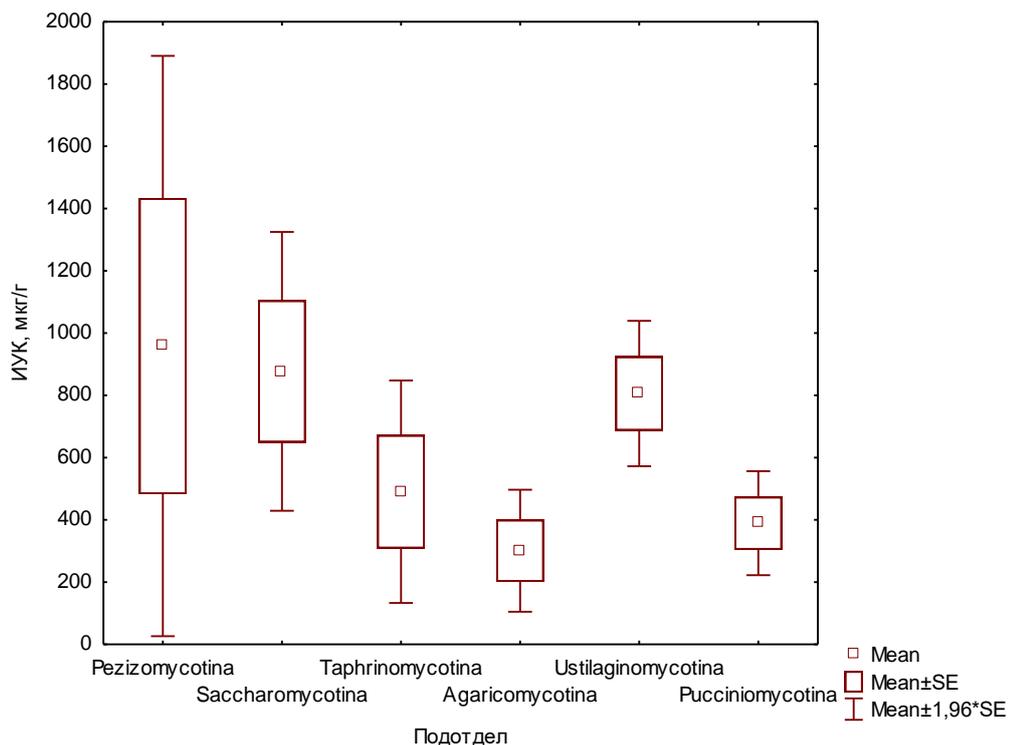


Рисунок 18. Продукция ауксина представителями исследованных подотделов дрожжевых грибов (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал).

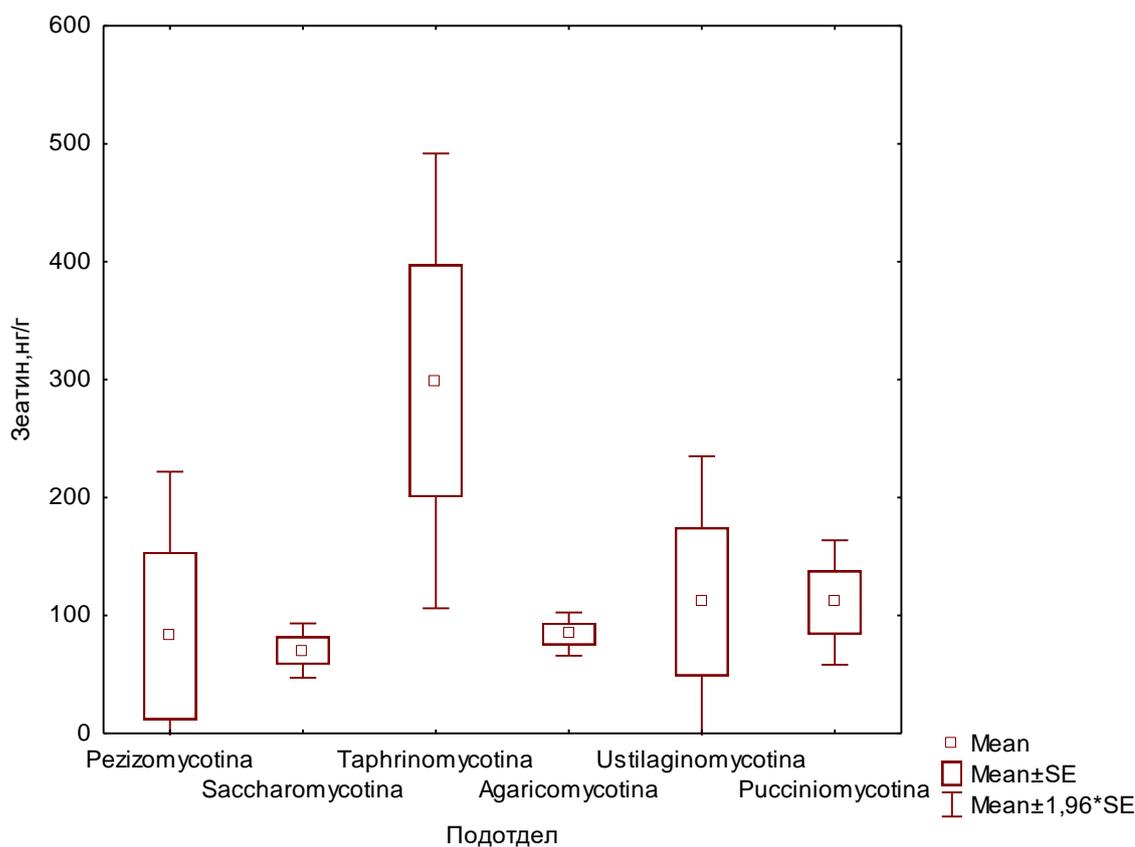


Рисунок 19. Продукция зеатина представителями исследованных подотделов дрожжевых грибов (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал).

Замечено, что дрожжи рода *Taphrina* массово выделяются со здоровых тканей растений, в отличие от мицелиальных грибов того же рода, которые обнаруживаются на инфицированных растениях. Это позволяет предполагать, что дрожжевые анаморфные линии рода *Taphrina* потеряли паразитическую стадию и стали представителями здоровой растительной микрофлоры (Inacio et al., 2004).

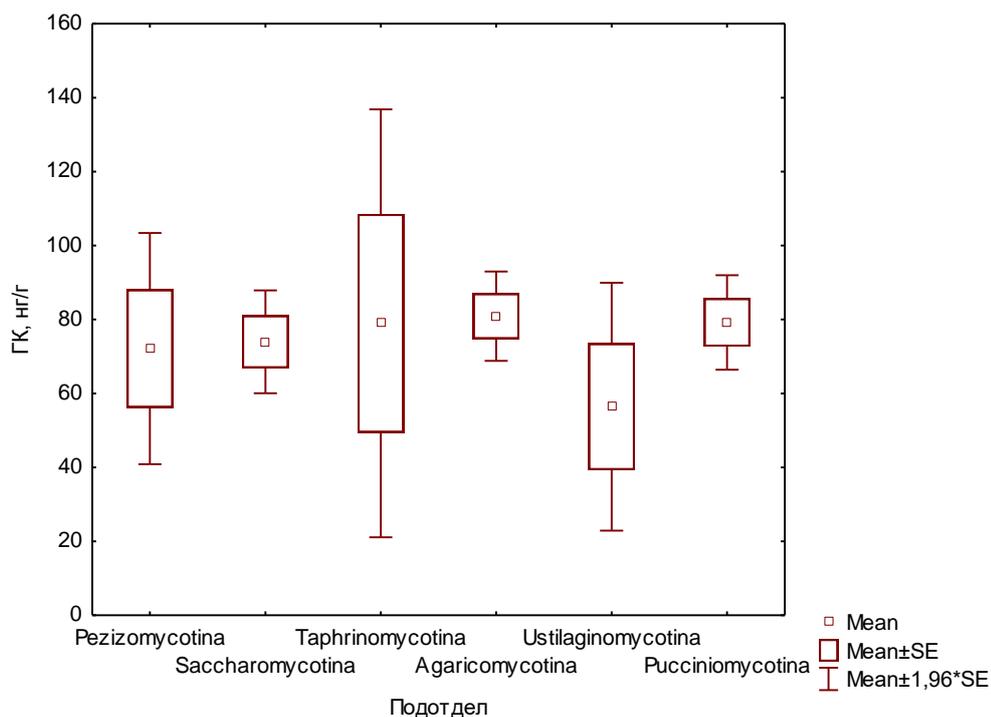


Рисунок 20. Продукция ГК₃ представителями исследованных подотделов дрожжевых грибов (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал).

По уровню синтеза гиббереллина дрожжи всех подотделов приблизительно равны (рис. 20).

3.5. Сравнение средней фитогормональной активности дрожжей по географическому признаку

Значительный интерес с точки зрения географии микроорганизмов представляет собой связь фитогормональной активности дрожжей с местом их обитания, в данном случае имеется в виду природная зона, выделяемая по среднегодовым показателям осадков и температуры. Данные других исследователей по ауксиногенной активности дрожжей получены, в основном, для тропического региона, в нашей же выборке присутствуют штаммы из всех климатических зон: от острова Шпицберген до острова Борнео. Действительно, возникает вопрос, – каким дрожжам выгодно стимулировать рост растений: проживающим в условиях тропиков с высокой

межвидовой конкуренцией и теплым и влажным климатом в сочетании с большим количеством растительных субстратов или же обитателям тундры, с суровыми климатическими условиями, малым количеством растительных экссудатов, но при этом меньшим количеством видов? Для систематизации мест выделения дрожжей нашей выборки мы воспользовались классификацией биомов Р. Уиттекера (Уиттекер, 1980). Биом - главный тип сообщества любого континента, выделяемый по физиономическим признакам. Всего автор выделяет 32 биома, распределяющиеся согласно экоклинам влажности и температуры. Далее, все эти биомы объединяются в 4 зоны, тропическую, теплую умеренную зон, холодную умеренную и арктико-альпийскую зону. На основании этой обобщенной классификации мы разделили места выделения дрожжей, принимая во внимание, что границы между зонами аппроксимированы. Соответственно, предгорный Дагестан попадает в теплую умеренную зону, а центральная Россия в холодную умеренную. Памир, как высокогорье, попадает в арктико-альпийскую зону вместе с тундровой зоной и островами северных морей. Вьетнам, Шри-Ланка и Борнео относятся к тропикам.

Анализ географической вариабельности показывает, что наиболее активно синтезируют ауксин штаммы, выделенные в тропической и теплой умеренной зонах. Штаммы из арктико-альпийской и холодной умеренной зон почти в три раза менее активны (рис. 21).

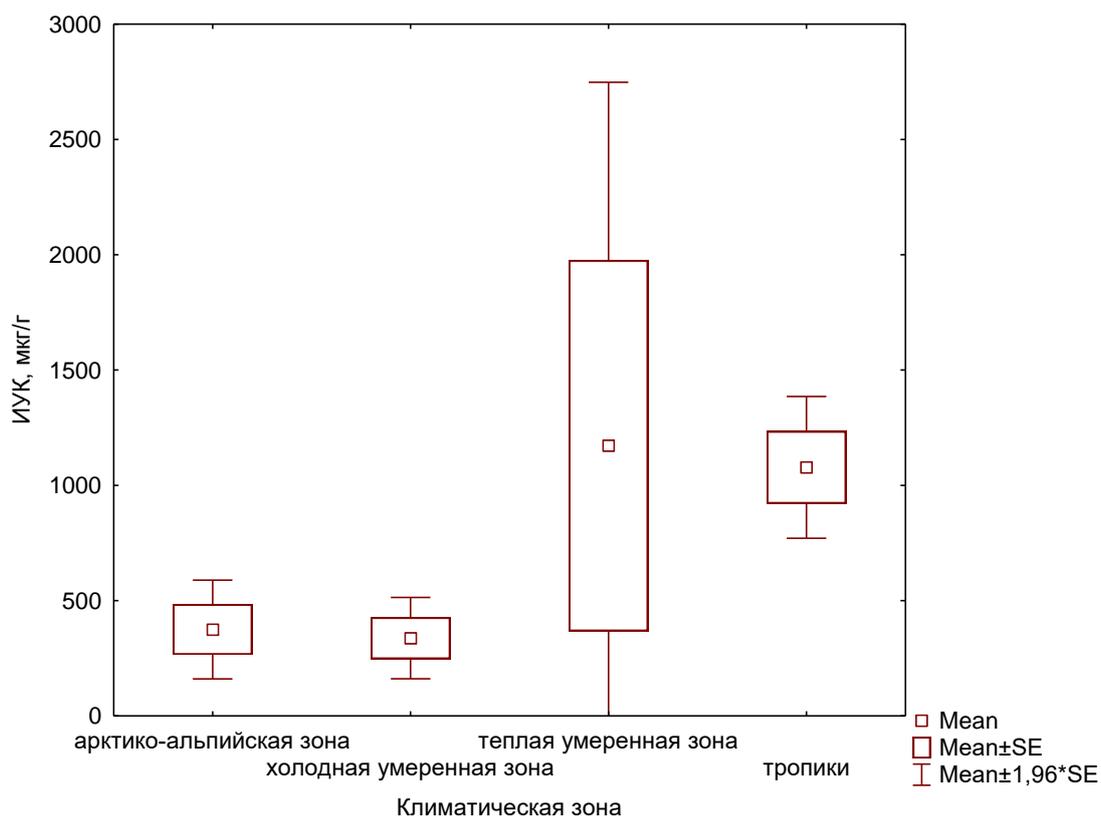


Рисунок 21. Продукция ИУК дрожжами разных климатических зон (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

Конкуренция между растениями влияет и на ассоциированные с ними микробные сообщества, производя отбор наиболее полезных растению штаммов. Общее предположение, почему тропические штаммы производят больше ауксина таково: более высокая круглогодичная физиологическая активность тропических растений по сравнению с растениями умеренных широт, а также формирование ими более крупных вегетативных и генеративных органов, в целом, требует больших концентраций физиологически активных веществ, к которым относится ауксин.

Возможна более конкретная причина большой «востребованности» у тропических растений именно ауксина – это необходимость постоянно развивать, во-первых, боковые корни и корневые волоски, поскольку тропическая почва бедна, а конкуренция за минеральные вещества высокая, во-вторых – якорные корни, поскольку быстрорастущие тропические деревья

должны успевать закрепляться в почве иначе могут просто не удержаться. Ауксин же, как раз вызывает активный ризогенез, т.к. сигнализирует о быстром развитии надземной части растения.

Таким образом, можно предположить, что более высокая ауксиногенная активность тропических штаммов – следствие совместной коэволюционной адаптации тропических растений и микроорганизмов к тропическим условиям.

Анализ географической варибельности способности к синтезу зеатина и гиббереллина демонстрирует обратную картину – тропические штаммы в среднем в несколько раз менее активны, чем выделенные из трех других зон, причем наблюдаются различия между тропической и теплой умеренной зонами, что прямо противоположно тому, что наблюдалось для ауксина (рис. 22-23).

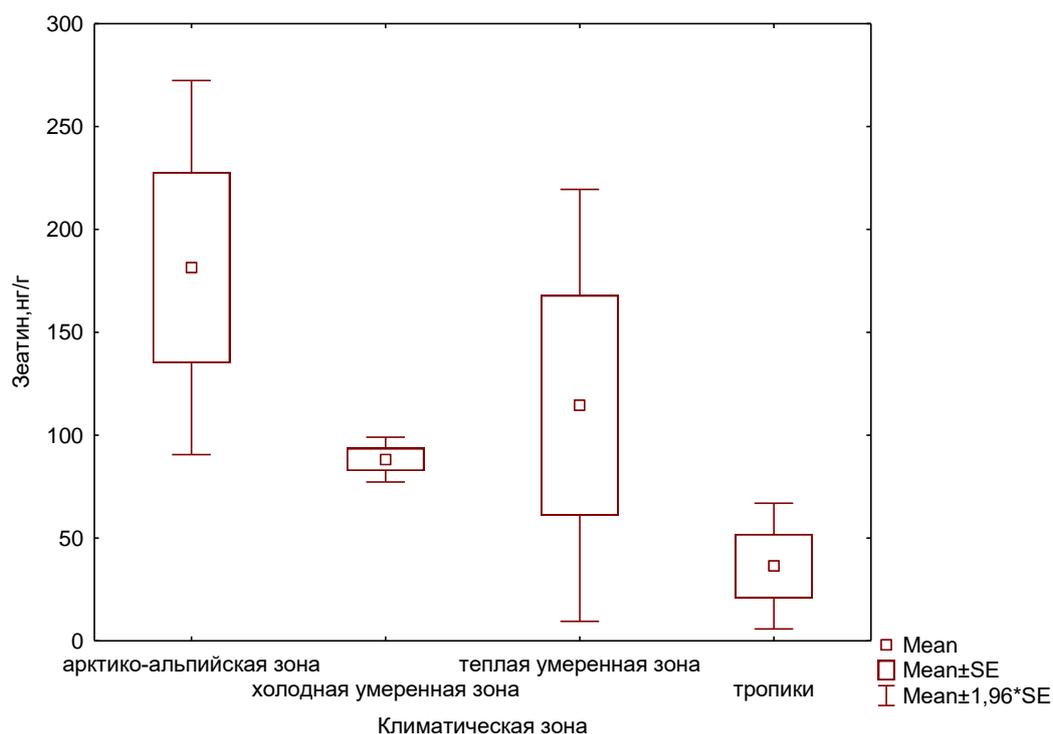


Рисунок 22. Продукция зеатина дрожжами разных климатических зон (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

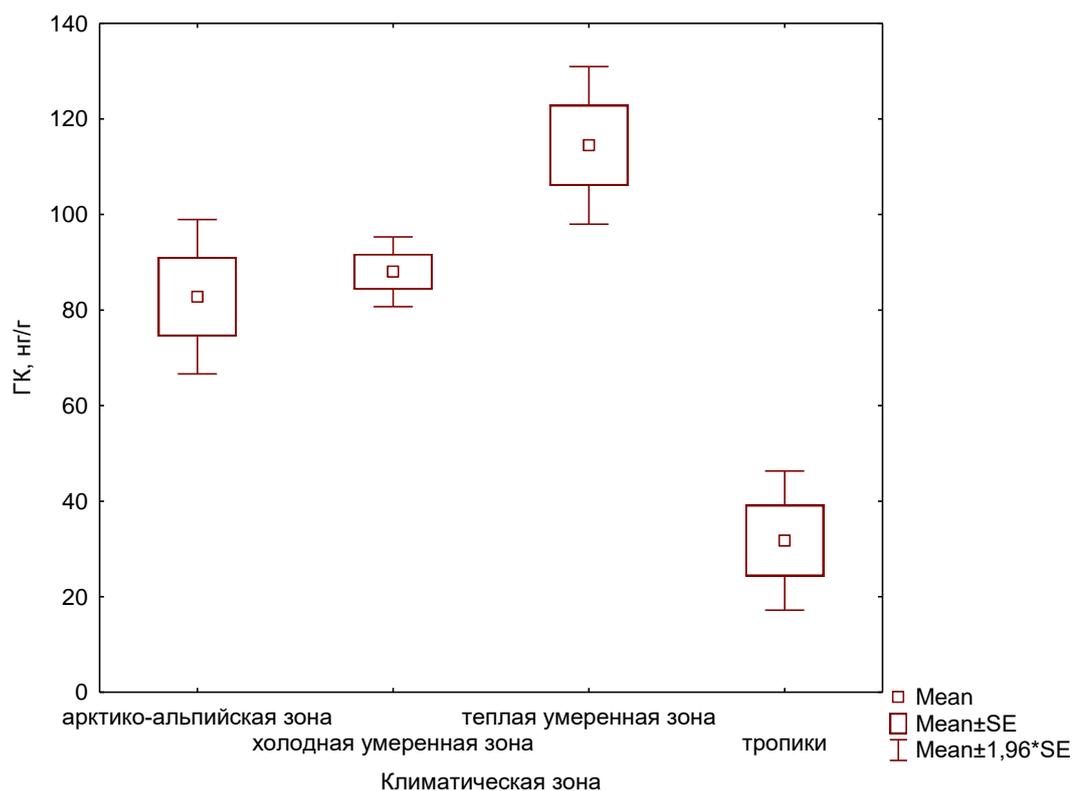


Рисунок 23. Продукция ГК₃ дрожжами разных климатических зон (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

У штаммов арктико-альпийской зоны максимальная активность отмечается по зеатину. У штаммов теплой умеренной зоны – по гиббереллину, правда, ненамного отличаясь от штаммов арктико-альпийской и холодной умеренной зоны.

Возможно, наблюдаемые географические закономерности отражают ход эволюции и формирования приспособлений, когда адаптация организмов из разных местообитаний идет в разном направлении.

В любом случае, дифференциация фитогормональной активности по географическому признаку демонстрирует важность фитогормональной активности дрожжей для биоценозов и является доказательством наличия эволюционного отбора по этому признаку.

3.6. Фитогормональная активность дрожжей из различных типов субстратов

Из первой главы стало понятно, что фитогормональная активность дрожжей обладает штаммовой природой. Отсюда можно сделать вывод, что анализ ее связи с теми или иными особенностями дрожжей стоит проводить, в том числе, ориентируясь именно на характеристики и свойства штаммов, а не только видов. В предыдущей главе мы изучили географическую зависимость по этому принципу, а теперь переходим к субстратной характеристике штаммов. Это тем более верный подход, учитывая, что разделение видов дрожжей на эпифитов, педобионтов и эврибионтов (Чернов, 2013) в значительной степени условно и только немногие виды могут быть уверенно отнесены к одной из этих групп. Эти группы позднее будут обсуждены отдельно.

Мы разделили субстраты на три крупные группы: высшие сосудистые растения, почва и прочие. В последнюю группу попали штаммы, выделенные из субстратов, не относящихся ни к почве, ни к растениям, в том числе выделенные из насекомых.

Как можно видеть на рисунке 24, субстратная зависимость фитогормональной активности по зеатину и ГК₃ имеет некоторую тенденцию к большей активности эпифитных штаммов. Для ауксина эта зависимость тоже есть, но проявляется слабее. В любом случае, мы можем говорить только о тенденциях, а не о достоверных различиях. А некоторые дрожжи, обнаруживаемые в почве, особенно в верхнем слое, возможно попали туда вместе с опадом. Типичные почвенные дрожжи – липомицеты в нашей выборке отсутствуют.

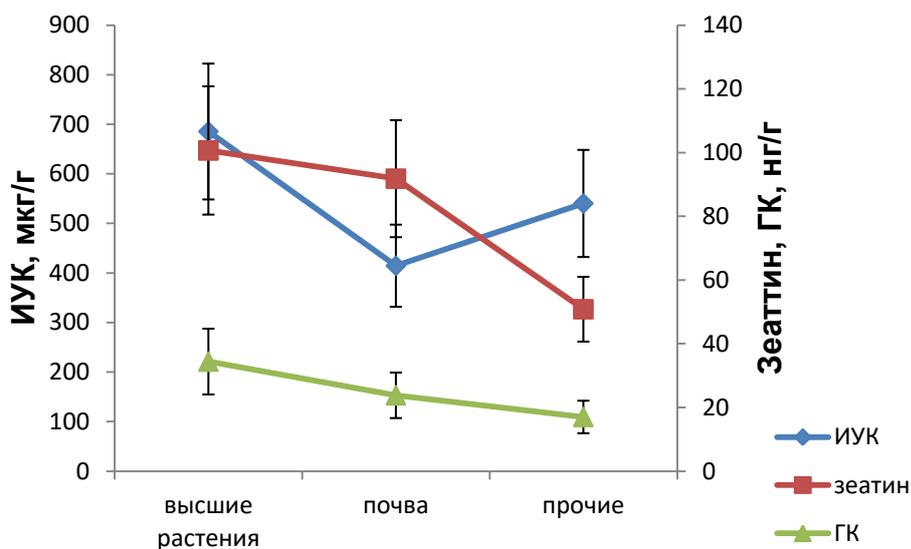


Рисунок 24. Средняя фитогормональная активность дрожжей в зависимости от субстрата выделения

Далее будет проведен более подробный анализ корреляции фитогормональной активности и экологических ниш дрожжей, учитывающий определенные физиологические и биохимические признаки.

3.7. Корреляция фитогормональной активности дрожжей с физиологическими и биохимическими свойствами, указывающими на тесную связь с растениями

Чтобы выявить дрожжи, наиболее тесно связанные с высшими растениями, мы выявили перечень признаков, которые свидетельствуют об адаптациях к эпифитному образу жизни (Приложение 3) (Kurtzman et al., 2011). В первую очередь, хотелось бы отметить, что филлосфера может считаться экстремальным местообитанием, поскольку наблюдаются резкие изменения условий: солнечной радиации, влажности и доступности питательных веществ. К тому же, некоторые растительные экссудаты могут иметь фунгицидное воздействие. Способность дрожжей утилизировать огромное число органических субстратов позволяет им колонизировать не

только гниющие плоды и цветочный нектар, но и непосредственно поверхность листьев. Самая общая наблюдающаяся закономерность для филлосферных дрожжей это доминирование базидиомицетов на листьях и неповрежденных плодах. Например, показано, что на целых ягодах винограда доминируют базидиомицетовые дрожжи и только после их созревания доминантами становятся аскомицетовые (Абдуллабекова и др., 2014). Это неудивительно, учитывая, что способностью бродить обладают в большинстве своем именно аскомицеты. Эта закономерность относится, по-видимому, к зонам холодного и умеренного климата. В тропической зоне аскомицеты иногда могут преобладать среди дрожжей в филлосфере (Limtong et al., 2014). Сравнение представителей разных отделов мы уже проводили и показали, что аскомицетовые дрожжи более активны в производстве ИУК.

Самый простой признак, указывающий на эпифитность - это пигментация, в первую очередь, за счет образования каротиноидов. Она важна как способ защиты от солнечного ультрафиолета. Тем не менее, необходимо отметить, что пигментированные дрожжи, также зачастую встречаются в экстремальных, не связанных с растениями местообитаниях (Russo et al., 2008; Libkind et al., 2009).

Также важно отметить, что и «белые» дрожжи рода *Filobasidium* зачастую бывают доминантами на листьях, хотя это, вероятно может быть связано с наличием у них другого класса фотопротекторных веществ – микоспоринов (Fonseca, Inacio, 2006). Мы провели анализ зависимости фитогормональной активности от пигментации и нам удалось обнаружить, что по активности синтеза зеатина выделяются пигментированные аскомицеты (рис. 25). К данной категории относятся представители рода *Taphrina*, их особенности и тесная связь с растениями уже были нами обсуждены, а также представители рода *Aureobasidium*, являющиеся

типичными обитателями филлосферы. Пигментированные базидиомицеты не продемонстрировали выраженной фитогормональной активности.

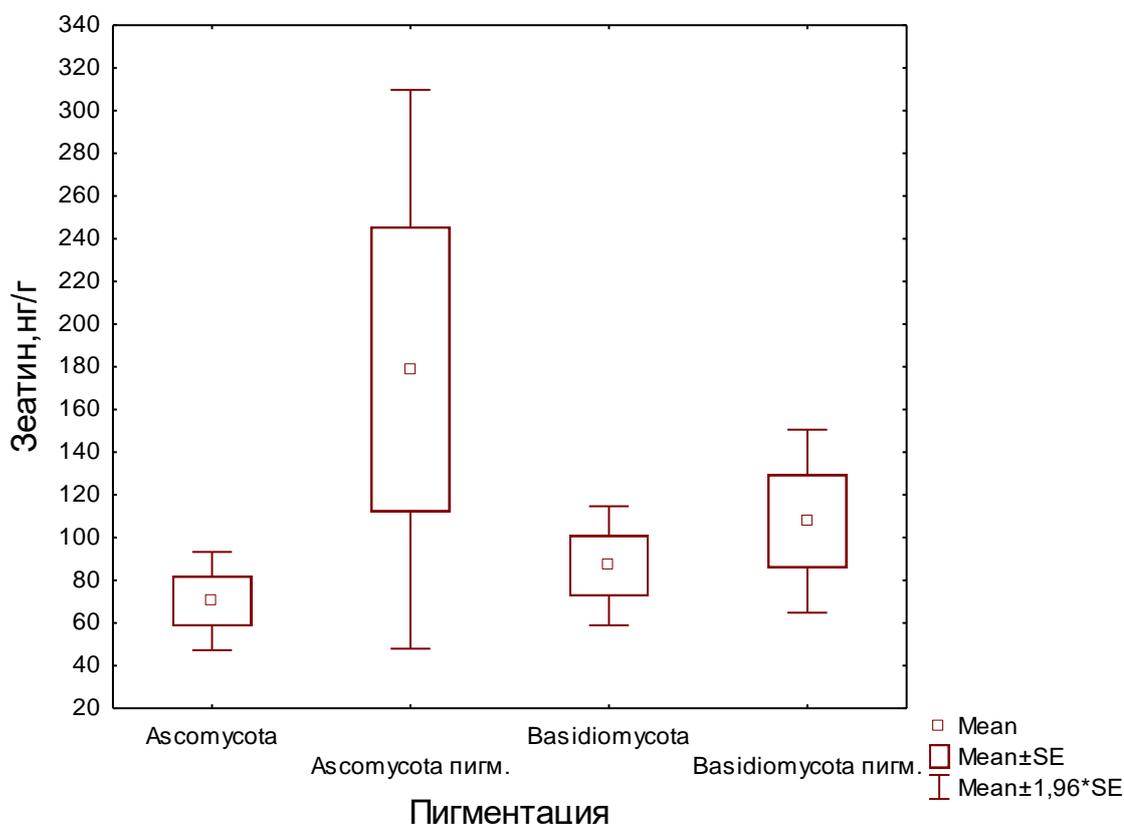


Рисунок 25. Фитогормональная активность пигментированных дрожжей

Для базидиомицетовых дрожжей не обнаружено существенной разницы между пигментированными и непигментированными видами

Второй важный для эпифитов признак – это формирование баллистоспор. Отстреливание спор выгодно для распространения в филлосфере, характеризующейся резкими перепадами условий, в частности, доступности субстратов. Вообще формирование баллистоспор стимулируется нехваткой питательных веществ (Fonseca, Inacio, 2006). Некоторые баллистоспоровые виды являются убиквистами, распространенными по всему миру, например, представленный в нашем исследовании *Sp. roseus*. Стоит также отметить, что все баллистоспоровые дрожжи в нашей выборке также являются пигментированными.

Как выяснилось, баллистоспоровые виды дрожжей в нашем исследовании более активны в производстве ауксина и сравнимы по этому показателю с аскомицетами (рис. 26). Также баллистоспоровые виды активнее синтезируют зеатин (рис 27). А вот по активности синтеза гиббереллиновой кислоты они, наоборот, уступают аскомицетам и прочим базидиомицетам (рис 28).

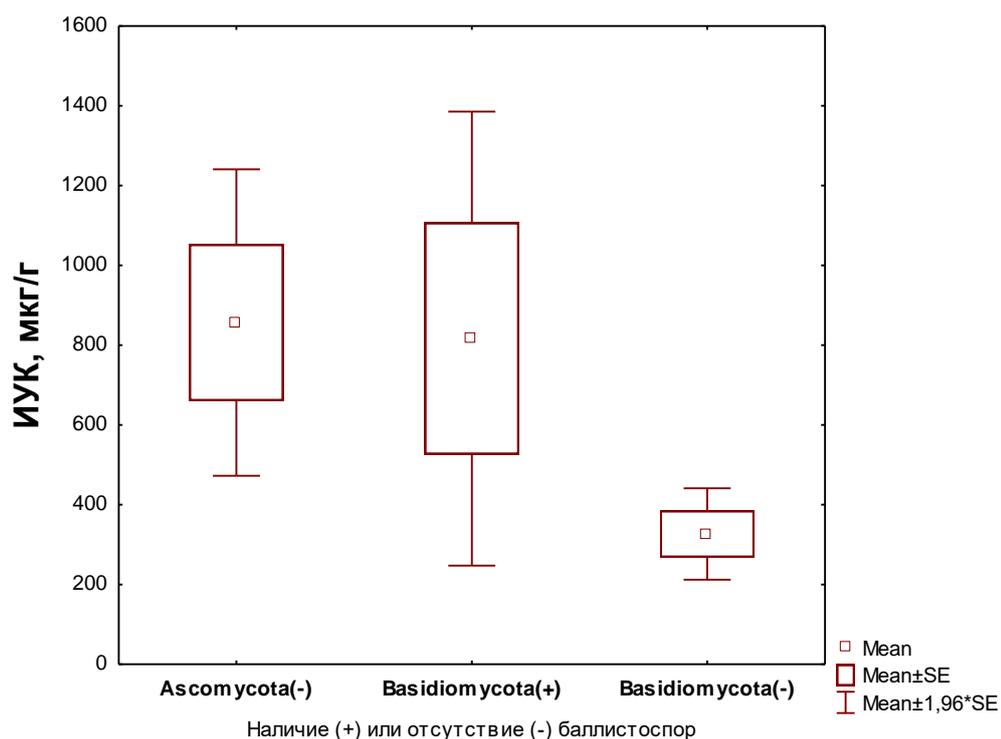


Рисунок 26. Активность синтеза ауксина баллистоспоровыми дрожжами

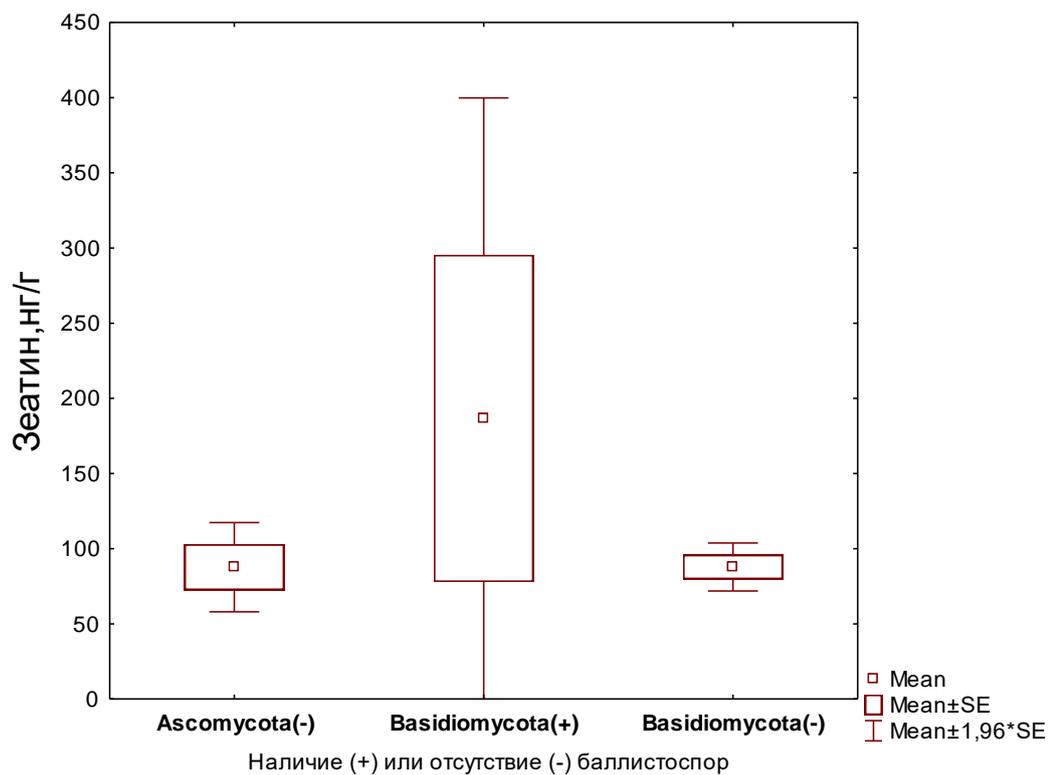


Рисунок 27. Активность синтеза зеатина баллистоспоровыми дрожжами

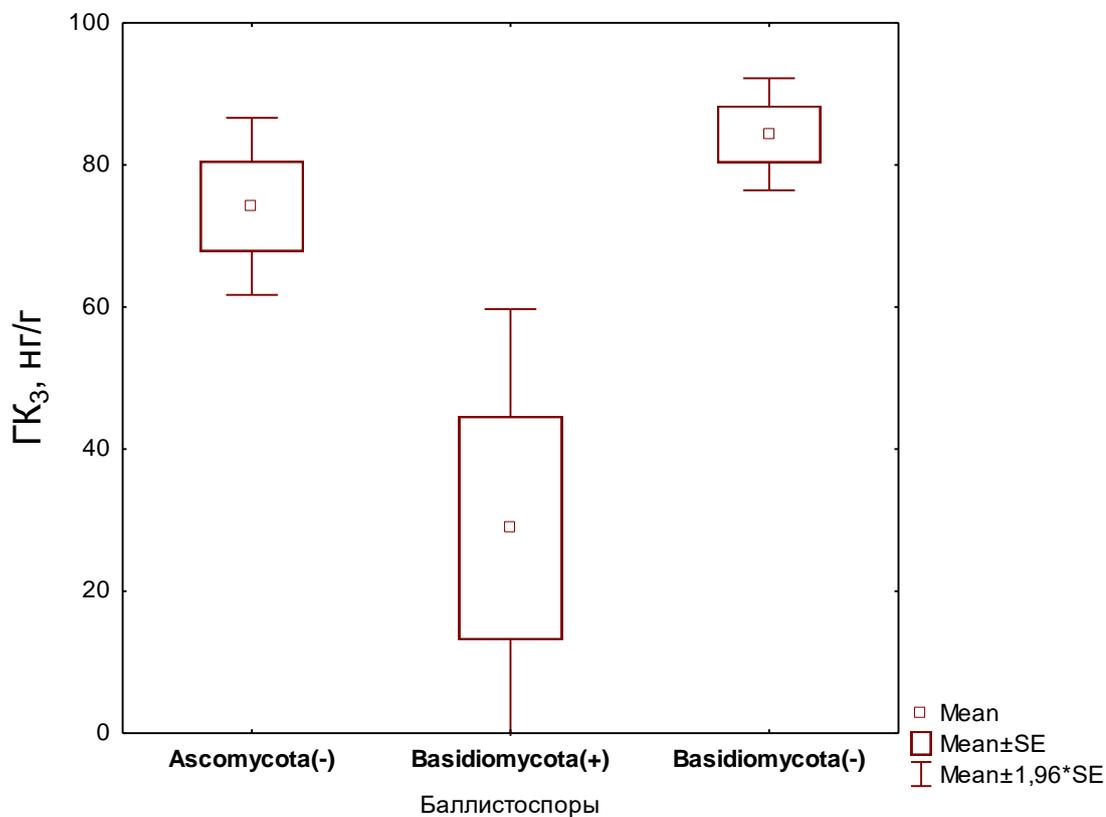


Рисунок 28. Активность синтеза гиббереллина баллистоспоровыми дрожжами

Другая важная группа признаков, указывающая на эпифитность и вообще тесную связь с растениями, это способность выделять экзоферменты, способствующие активному извлечению питательных веществ из растительных тканей (Kinkel, 1991; Morris, 2001). К таким экзоферментам относятся протеазы, кутиназы, пектиназы, липазы, амилазы и целлюлазы. Существует ряд исследований, посвященных этому вопросу и можно сказать, что эпифитные дрожжи обладают способностью разрушать растительные ткани за счет выделения этих ферментов. В частности показана высокая липолитическая активность представителей порядка *Sporidiobolales*, которые характеризуются также пигментацией, и формированием баллистоспор. Необходимо отметить, что ферментная активность дрожжей это штаммовзависимый признак (Fonseca, Inacio, 2006).

Больше всего литературных данных собрано по пектиназной активности дрожжей. Легко выяснить, что пектиназная активность природных штаммов дрожжей сравнительно редкое явление. Например, вот результаты одного крупного исследования (таб. 4) (Buzzini, Martini, 2002) В таблице приведены виды, которые фигурируют в нашем исследовании. Можно заметить, что только среди штаммов *Aureobasidium pullulans* пектиназная активность встречается относительно часто. Это подтверждается также и другими исследованиями. Например, показано, что из 78 выделенных с поверхности винограда штаммов, только 9 были способны к синтезу пектиназ, 6 из них относились к виду *Aureobasidium pullulans* (Merín, Mendoza, 2014).

Debaryomyces hansenii и *Saccharomyces cerevisiae* также способны производить пектиназы (da Silva et. al, 2005; Oskaya, Yalçınb, 2015), но только для *Aureobasidium pullulans* можно констатировать широкое распространение данного явления.

Таблица 4

Распространение пектиназной активности среди природных дрожжей (Buzzini, Martini, 2002)

Вид	КОЛ-ВО ШТАММОВ	
	общее	продуценты пектиназ
<i>Aureobasidium pullulans</i>	46	10
<i>Candida maltosa</i>	17	0
<i>Candida sake</i>	12	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	18	0
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	5	0
<i>Pichia guilliermondii</i>	8	1
<i>Pichia membranifaciens</i>	30	0
<i>Pichia ohmeri</i>	4	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	0
<i>Cryptococcus laurentii</i>	30	2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	17	0

В нашем исследовании представлено 3 штамма данного вида, все они синтезируют ИУК и ГК₃, а два способны продуцировать зеатин. Два из трех, соответственно, синтезируют 3 фитогормона сразу и относятся к крайне небольшой группе дрожжей в нашем исследовании, проявляющих общую фитогормональную активность, представленной всего 8 штаммами. В литературном обзоре отмечалось, что по данным других исследователей *Aureobasidium pullulans* обладает, внутри исследуемых выборок, либо большей частотой встречаемости способности к синтезу ауксина (Limtong, Koowadjanakul, 2012), либо большей синтетической активностью по данному гормону (Ignatova et. al 2015; Fu et. al., 2016).

То есть можно сказать, что данный вид относится к высокоактивным продуцентам фитогормонов. Также он является широко распространенным в филлосфере (Beech, Davenport, 1970; Breeze, Dix, 1981; Mishra, Dickinson,

1981), что, может быть связано и с пектиназной и с фитогормональной активностью.

Также была проанализирована зависимость фитогормональной активности от таких признаков как наличие амилаз, способность роста без витаминов, способность к брожению на глюкозе, сахарозе и галактозе. Но значимых различий обнаружено не было.

3.8. Влияние дрожжей, синтезирующих фитогормоны, на рост и развитие растений

3.8.1. Влияние дрожжей на скорость прорастания семян пшеницы

Полученные нами результаты показали, что живые клетки дрожжей, при совместном применении с автолизатом пивных дрожжей, способны значительно ускорять прорастание семян пшеницы сорта «Эстер» (рис. 29). Максимальный стимулирующий эффект по эмиссии CO_2 достигал 27,3 %. При применении дрожжей без автолизата или автолизата без дрожжей эффект по эмиссии углекислого газа не превышал 11%. Эмиссия CO_2 из смеси автолизата с дрожжами при стандартных условиях, но без семян практически отсутствовала. Отсутствие дыхания самих дрожжей в эксперименте, подтвержденное соответствующим вариантом контроля, означает, что клетки не успевают перейти к фазе логарифмического роста и за 24 часа эксперимента, учитывая резкую смену условий культивирования, их количество практически не возрастает. Тем не менее, дрожжевые метаболиты, вырабатываемые живыми клетками, влияют на прорастание проростков, что мы и наблюдали.

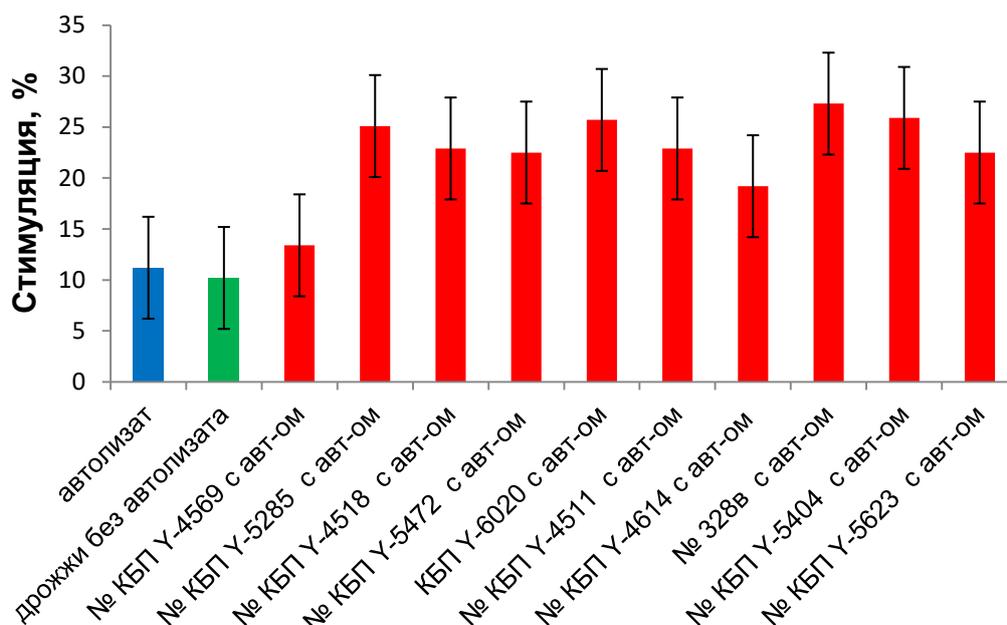


Рисунок 29. Стимуляция (%) прорастания пшеницы природными штаммами дрожжей с добавкой дрожжевого автолизата по отношению к контролю на воде

Длительность эксперимента была слишком маленькой для полной оценки эффекта, и ее нельзя было увеличить, т.к. на более поздних сроках измерение эмиссии было практически невозможно. Также измеряемый показатель не дает информации о динамике развития отдельных частей проростков, что делает невозможным дифференцированное рассмотрение эффектов фитогормонов.

Поэтому были проведены эксперименты, не страдающие данными ограничениями. Они описаны в следующем разделе.

3.8.2. Влияние культуральной жидкости дрожжей на рост проростков кресс салата

Мы выбрали 6 наиболее представительных штаммов, проявляющих высокую активность по различным гормонам:

КБП У-6020 - *Metschnikowia pulcherrima*,

КБП У-5419 - *Rhodotorula mucilaginosa*,

КБП У-5396 - *Aureobasidium pullulans*,

КБП Y-4614 - *Saitozyma podzolica*,
 КБП Y-5132 - *Pseudozyma hubeiensis*,
 КБП Y-5475 - *Candida trypodendroni*.

Измеренные концентрации фитогормонов приведены в таблице 5.

Таблица 5

Фитогормональная активность исследуемых штаммов

штамм	ИУК	Зеатин	ГК ₃	штамм	ИУК	Зеатин	ГК ₃
	мкг/л	нг/л			мкг/л	нг/л	
КБП Y-6020 <i>M. pulcherrima</i>	18693,3	3201,3	906,7	КБП Y-4614 <i>S. podzolica</i>	22206,7	0,0	0,0
КБП Y-5396 <i>A. pullulans</i>	766,7	260,0	340,0	КБП Y-5132 <i>P. hubeiensis</i>	60,0	2386,7	0,0
КБП Y-5419 <i>R. mucilaginosa</i>	7593,3	150,0	53,3	КБП Y-5475 <i>C. trypodendroni</i>	5033,3	0,0	460,0

Соответственно, штаммы КБП Y-6020 (*Metschnikowia pulcherrima*), КБП Y-5396 (*Aureobasidium pullulans*) и КБП Y-5419 (*Rhodotorula mucilaginosa*) проявляют высокую активность по всем трем гормонам и обозначаются как «первая группа» – наиболее важные. Сначала было исследовано влияние этих штаммов на рост кресс салата, чтобы оценить весь возможный спектр эффектов. Оказалось, что культуральная жидкость данных штаммов вызывает сразу три эффекта: удлинение корня, удлинение стебля и увеличение общей массы проростков (рис.30-32).

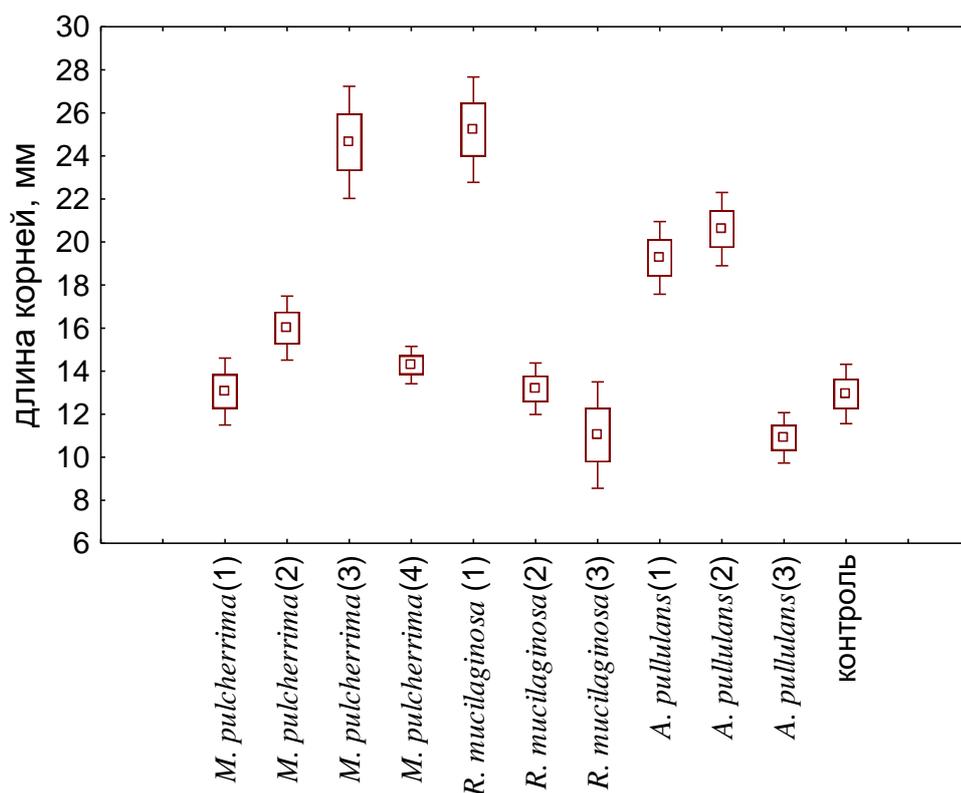


Рисунок.30. Изменение длины (мм) корней проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штаммов дрожжей в разведениях: (1) -1/1000, (2)-1/10000, (3)-1/100000, (4)-1/1000000 (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

Корень по сравнению с контролем увеличивается до 2 раз, стебель до 1,5 раз. До 35% увеличивается масса проростков. Наиболее активный продуцент ауксина штамм КБП Y-6020 (*M. pulcherrima*) проявляет максимальную стимуляцию длины корня при разведении 1:100000. Для достижения такого же эффекта культуральную жидкость штамма КБП Y-5419 (*Rh. mucilaginosa*) достаточно развести в 1000 раз. Данный штамм хотя и синтезирует в ауксин, но значительно уступает штамму КБП Y-6020 по максимальной концентрации. Штамм КБП Y-5396 (*A. pullulans*) стимулирует рост корня заметно слабее, чем два других штамма, при этом он наименее активен в синтезе гормонов, в т.ч. и ауксина. По стимуляции длины стебля и общей массы проростка все штаммы похожи по величине максимальных эффектов, но для их достижения также требуются разные разведения культуральной жидкости.

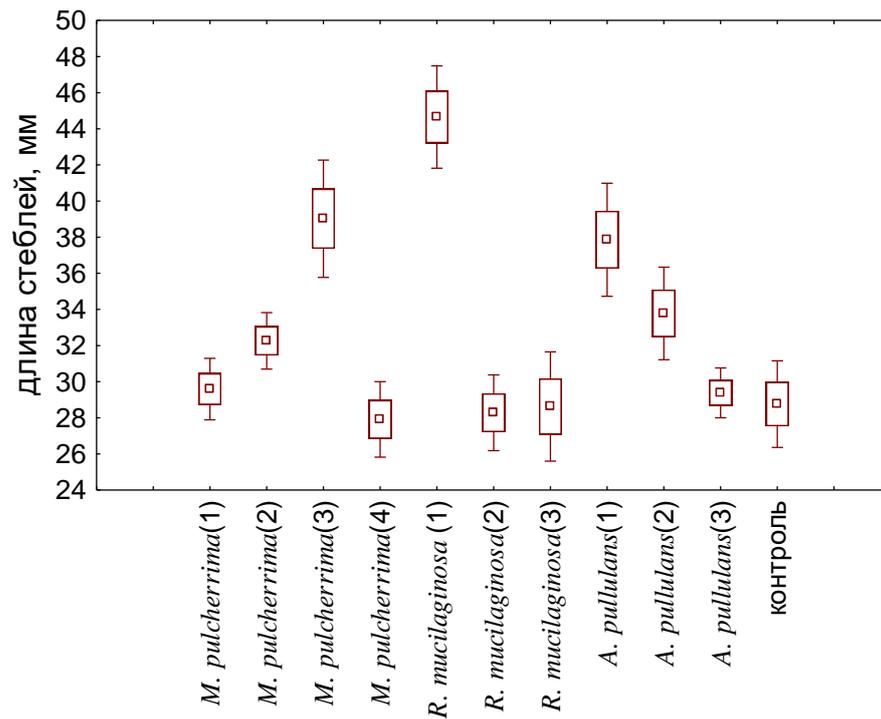


Рисунок 31. Изменение длины (мм) стеблей проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штаммов дрожжей в разведениях: (1) -1/1000, (2)-1/10000, (3)-1/100000, (4)-1/1000000 (среднее, ошибка среднего и 95% доверительный интервал)

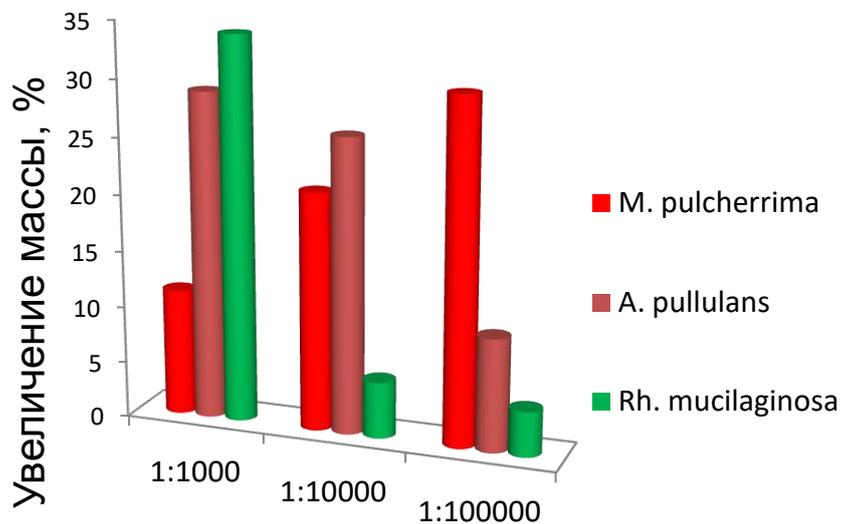


Рисунок 32. Изменение массы (%) проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости дрожжей по отношению к контролю в разных разведениях

Остальные штаммы были отнесены ко «второй группе» - способных синтезировать только некоторые гормоны, с целью изучения их эффектов (таб. 4)

Штамм № КБП Y-4614 (*Saitozyma podzolica*) – высокоактивный производитель ауксина неспособный к синтезу зеатина и ГК₃. Его культуральная жидкость вызывает стимуляцию роста корней более чем в три раза в разведении 1:100000. При этом увеличения длины стебля не наблюдается. Максимальная прибавка к массе проростка - порядка 16% (рис. 33)

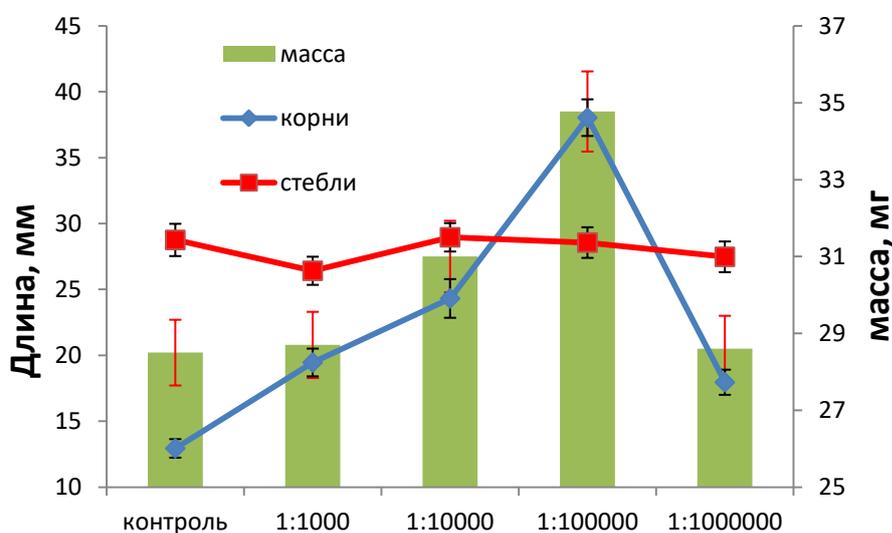


Рисунок 33. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штамма КБП Y-4614 в разном разведении

Культуральная жидкость штамма № КБП Y-5132 (*Pseudozyma hubeiensis*), активно синтезирующего зеатин, малоактивного производителя ИУК и не способного к синтезу ГК₃, стимулирует удлинение стебля в 1,5 в максимальном разведении, чего не наблюдается у штамма № КБП Y-4614 (*S. podzolica*) (рис. 34). Также наблюдается небольшое, по сравнению со штаммом № КБП Y-4614, удлинение корня в разведении 1:1000 на 20%. Прибавка массы такая же, как у штамма КБП Y-4614. Вероятно, стимуляция длины стебля связана с синтезом зеатина.

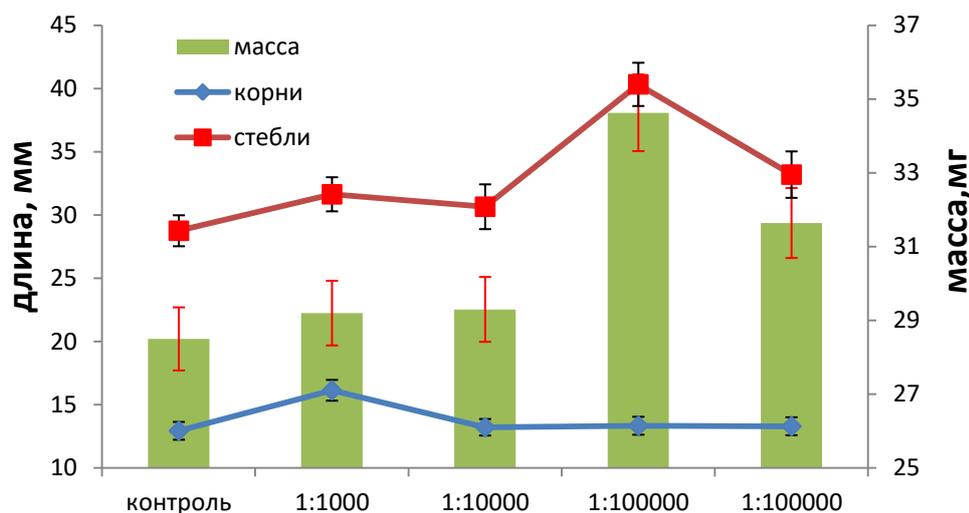


Рисунок 34. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (мг) проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штамма № КБП Y-5132 в разном разведении

Штамм № КБП Y-5475 (*Candida trypodendroni*), активный производитель ГК₃ и ИУК, но не способный к синтезу зеатина, в разведении 1:1000 стимулирует удлинение корня в 3,5 раза и одновременно увеличение массы проростков на 18% при отсутствии эффектов на корне, что примерно соответствует значениям, полученным для штамма № КБП Y-4614 (*S. podzolica*), который также активно синтезирует ИУК и не продуцирует зеатин. При этом в разведении 1:100000 штамм № КБП Y-5475 (*C. trypodendroni*), не влияя на длину корня, стимулирует удлинение стебля в 1,5 раза, т.е как в случае с № КБП Y-5132 (*P. hubeiensis*), хотя № КБП Y-5475 (*C. trypodendroni*) не синтезирует зеатин. Возможно этот эффект связан с присутствием ГК₃ в культуральной жидкости (рис.35).

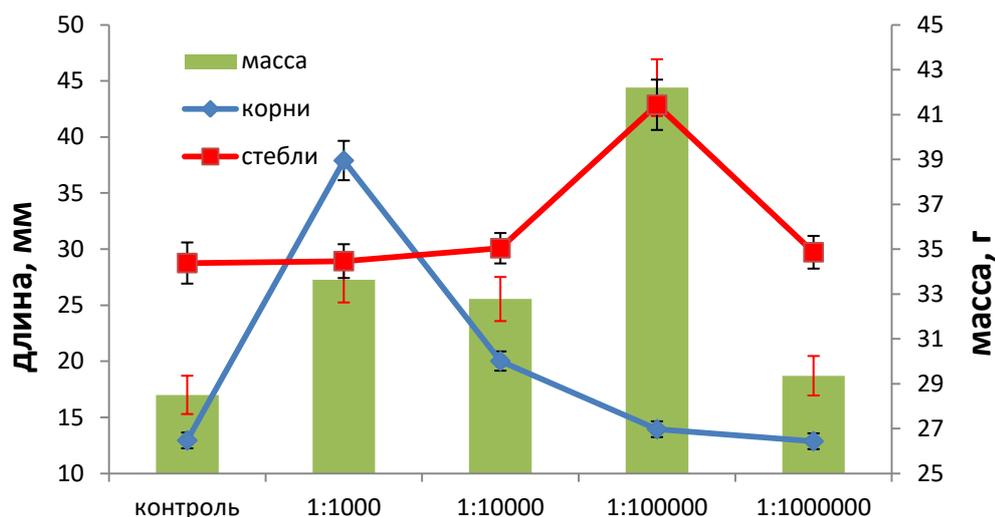


Рисунок 35. Изменение длины (мм) корней и стеблей и массы (г) проростков кресс салата под влиянием культуральной жидкости штамма № КБП У-5475 (*C. trypodendroni*) в разном разведении

Интенсивность синтеза фитогормонов и выраженность эффектов на рост кресс салата у разных штаммов дрожжей приведена в таблице 6 в обобщенной форме. Можно видеть, что стимуляция роста корня связана с присутствием ауксина, а на рост стебля влияют зеатин и гиббереллин. Значительное увеличение (до 30%) массы проростка также связано с присутствием гиббереллина.

Таблица 6

Проявление фитогормональной активности исследованными дрожжами и оказание эффектов на рост проростков кресс салата: (+) - свойство ярко выражено; (+/-) - свойство слабо выражено; (-) - свойство не выражено

№ штамма	ИУК	Зеатин	ГК ₃	Стимуляция корней	Стимуляция стеблей	Увеличение массы
<i>M. pulcherrima</i>	+	+	+	+	+	+
<i>A. pullulans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Rh. mucilaginosa</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. podzolica</i>	+	-	-	+	-	+/-
<i>P. hubeiensis</i>	+/-	+	-	+/-	+	+/-
<i>C. trypodendroni</i>	+	-	+	+	+	+

Необходимо учитывать, что фитогормоны действуют совместно, образуя баланс, определяющий эффекты. Также нужно иметь в виду, что в культуральной жидкости присутствуют и другие биологически активные вещества, в частности, фенольные соединения и органические кислоты, которые также влияют на рост растений. Тем не менее, можно констатировать, что дрожжи оказывают разные эффекты на рост проростков, обладая при этом различной фитогормональной активностью. К тому же, культуральная жидкость в экспериментах использовалась в большом разведении, когда многочисленные нецелевые соединения оказываются в низких концентрациях и их физиологическая активность должна быть слабо выражена.

Обнаружение стимулирующего влияния дрожжей на культурные растения, связанного с фитогормональной активностью, может стать основой для разработок новых биологических удобрений.

3.9. Динамика накопления фитогормонов в культуральной жидкости дрожжей

В аспекте изучения динамики фитогормонов в культуральной жидкости перед нами стояла задача определить, как скорость накопления биомассы соотносится со скоростью образования ауксина, гиббереллина и зеатина. Этот показатель является очень важным, т.к. характеризует происхождение метаболитов. Например, антибиотики, как типичные вторичные метаболиты образуются в стационарной фазе роста культуры (Егоров, 2004). Вещества, относящиеся к основному метаболизму клетки, накапливаются на стадии экспоненциального роста (Перт, 1978). В литературном обзоре было показано, что у бактерий фитогормоны образуются по динамике первого типа. У дрожжей, как оказалось, разные типы динамики характерны для разных гормонов.

Динамики накопления ауксина и зеатина очень похожи, хорошо видно, что вещества накапливаются в стадии экспоненциального роста (рис. 36-37). Динамика гиббереллина строго противоположна: он начинает образовываться в стационарной фазе, динамика его накопления представляет собой практически прямую линию (рис. 38).

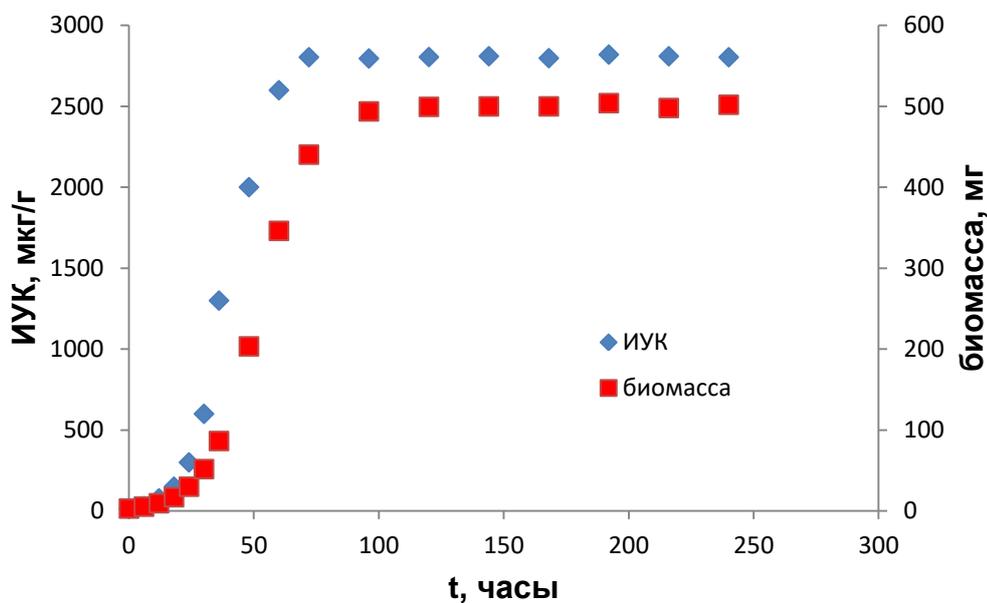


Рисунок 36. Динамика роста культуры и накопления ауксина в среде

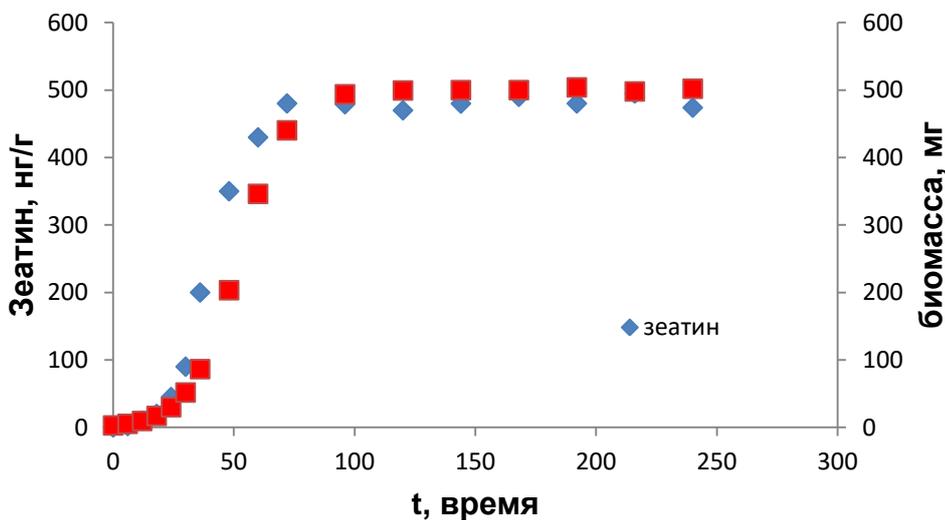


Рисунок 37. Динамика роста культуры и накопления зеатина в среде

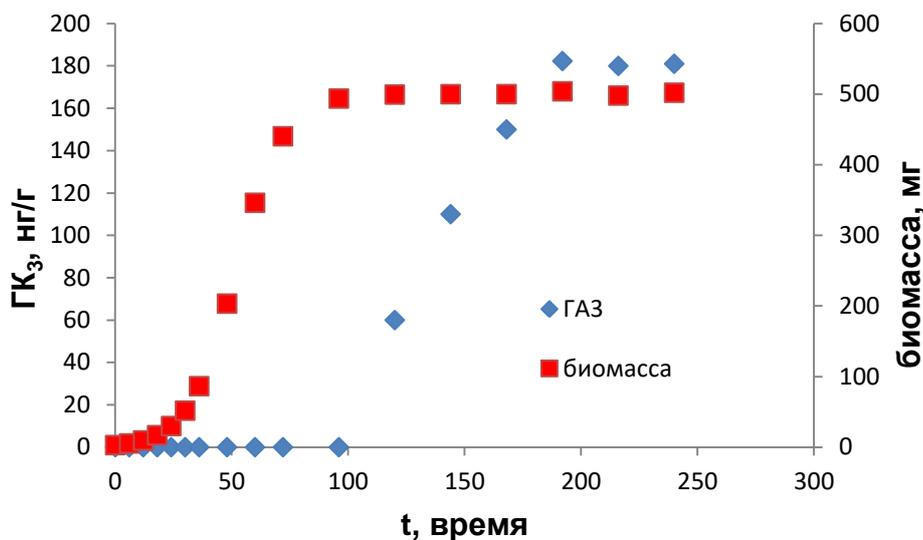


Рисунок 38. Динамика роста культуры и накопления GK_3 в среде

Кривая роста культуры соответствуют общему представлению о ее типичном виде при росте на лимитированном субстрате (Перт, 1978) (рис. 39).

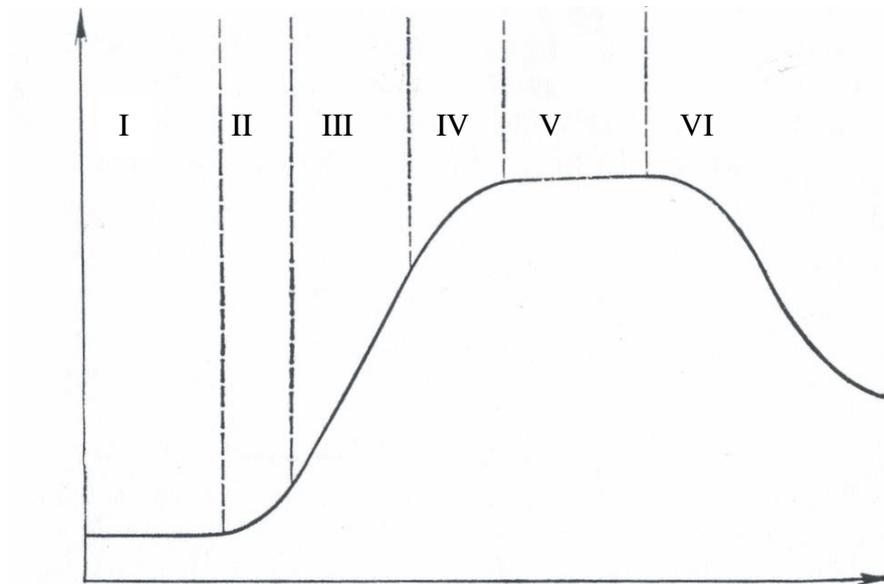


Рисунок 39. Шесть фаз на кривой роста периодической культуры (Перт, 1978).

I-лаг-фаза; II-фаза ускорения роста; III-фаза экспоненциального роста; IV-фаза замедления роста; V-стационарная фаза; VI-фаза отмирания

На некотором начальном отрезке рост культуры должен подчиняться закону $x = x_0 e^{\mu t}$, где μ – удельная скорость роста, чтобы считаться логарифмическим или экспоненциальным. Так как необходимые условия для этого соблюдаются (постоянство состава среды и биомассы), то мы предположили, что рост нашей культуры является таковым.

Чтобы это проверить, а также оценить длительность лаг-фазы и узнать удельную скорость роста, мы провели логарифмическое преобразование (рис 40)

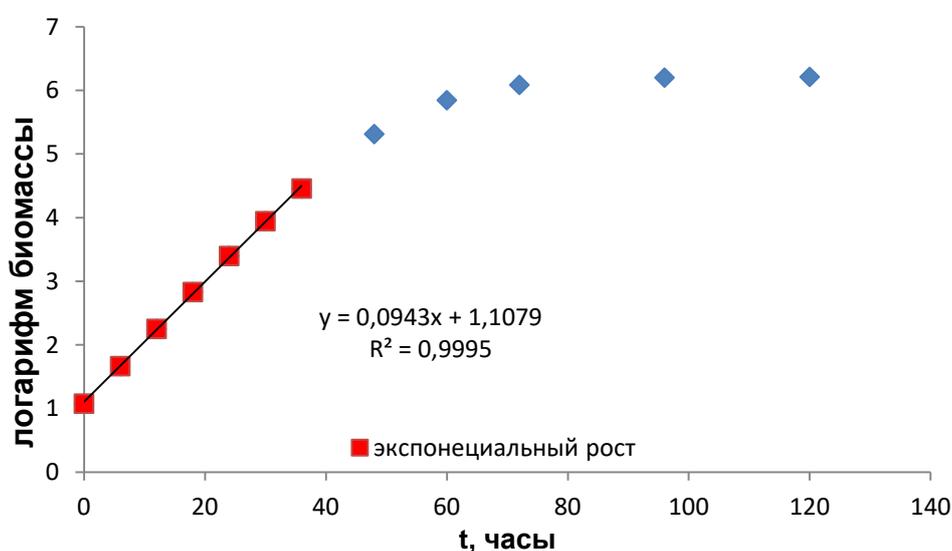


Рисунок 40. Логарифмическое преобразование кривой роста

Угол наклона кривой в стадии экспоненциального роста характеризует удельную скорость роста культуры. Хорошо видно, что стадия экспоненциального роста наблюдается в течение 36 часов, далее начинается фаза замедления, $\mu=0,0943 \text{ ч}^{-1}$. Высокий коэффициент корреляции показывает, что рост в первые 1,5 суток можно считать логарифмическим. Также обращает на себя внимание отсутствие лаг-периода, этого удалось добиться двухстадийным культивированием, когда в эксперимент вводится культура уже находящаяся в экспоненциальной фазе роста.

Была проведена дополнительная проверка возможности аппроксимации полученной кривой роста культуры логистической кривой,

описываемой уравнением Ферхюльста: $\frac{dN}{dt} = \mu P \left(1 - \frac{N}{K}\right)$, где N – биомасса, r – скорость роста, а K – максимальная емкость среды. Решение данного уравнения:

$$N(t) = \frac{KN_0 e^{\mu t}}{K + N_0(e^{\mu t} - 1)}$$

Мы рассчитали значения $N(t)$ и построили график зависимости от времени, учитывая, что значения μ и N_0 нам известны из уравнения экспоненциального роста культуры (рис. 40). « K » в нашем случае это максимальное количество полученной биомассы.

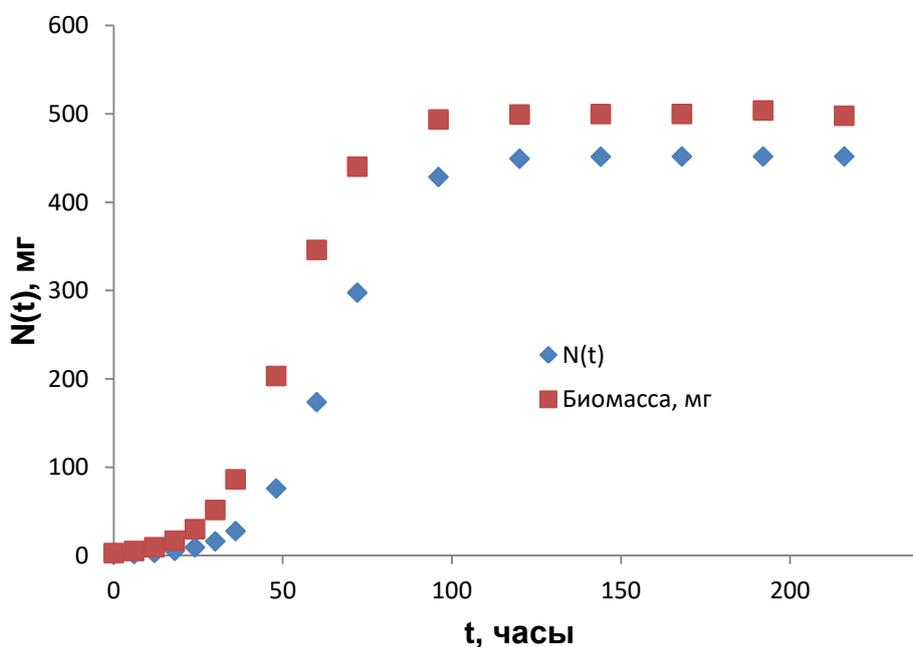


Рисунок 41. Предсказанная логистическая кривая роста культуры, рассчитанная согласно имеющимся коэффициентам и реальная, полученная в эксперименте

Можно видеть, что полученная нами кривая роста ненамного отличается от вычисленной, что является дополнительным подтверждением правильности расчета удельной скорости роста культуры μ (рис. 41).

Исходя из того, что кривые накопления ауксина и зеатина в целом соответствует кривой роста культуры, мы предполагаем, что образование этих фитогормонов прямо пропорционально росту и рассчитываем удельную скорость образования продукта из следующего уравнения (Перт, 1978):

$p = p_0 + q_p N_0(e^{\mu t_1} - 1)/\mu$, где p – концентрация продукта, q_p – удельная скорость образования продукта. Для удобства приводим данное уравнение в линейный вид ($p=p_0+q_p*z$), где p – продукт. Соответственно $z = \frac{N_0}{\mu}(e^{\mu t_1} - 1)$, где N_0 биомасса в начальный момент времени, который получена из уравнения экспоненциального роста культуры (рис.40). Рассчитываем значения z и строим график зависимости p от z (рис.42-43), угол наклона которого характеризует q_p .

Соответственно, для ИУК $q_p=1,38$ мкг/мг*час, а для зеатина $q_p=4,62$ нг/мг*час

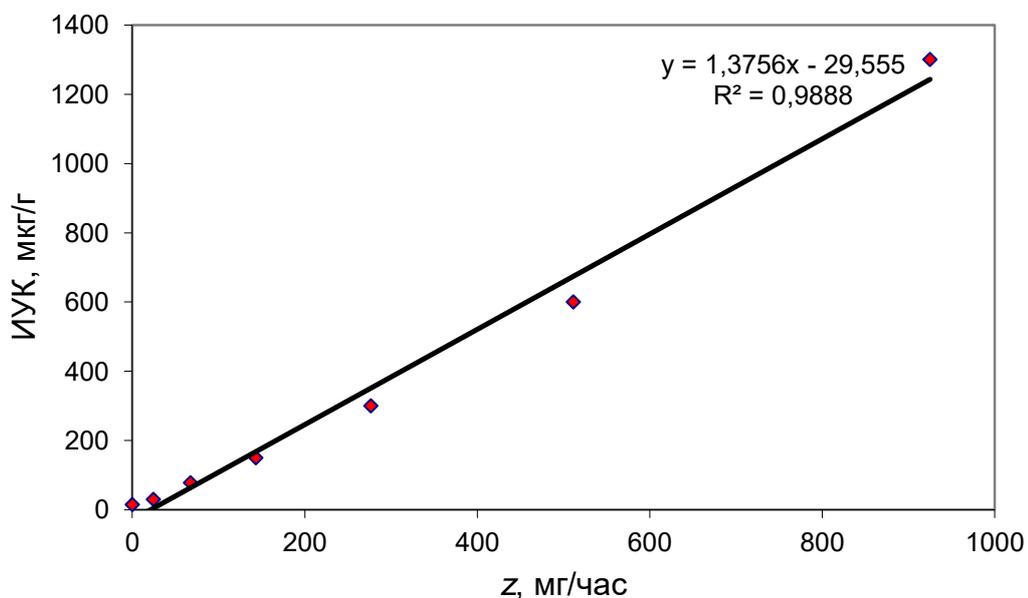


Рисунок 42. Зависимость накопления ИУК в среде от прироста биомассы

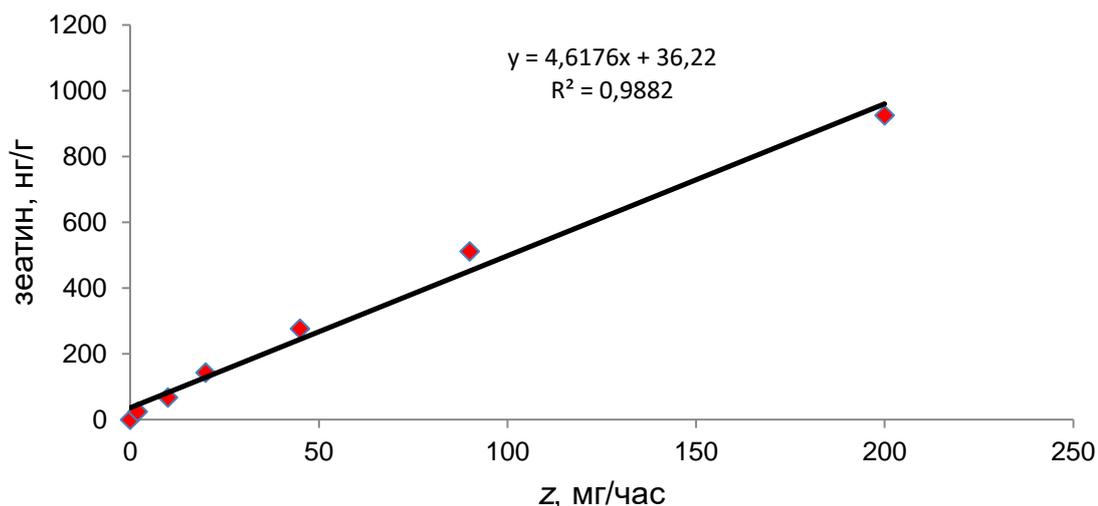


Рисунок 43. Зависимость накопления зеатина в среде от прироста биомассы

Высокие коэффициенты корреляции между скоростью накопления биомассы (z) и концентрациями зеатина и ИУК доказывают наше предположение, что синтез этих фитогормонов прямо пропорционален приросту биомассы дрожжей в культуре.

Гиббереллин в среде начинает образовываться по истечению 4 суток, в то время как экспоненциальная фаза роста самой культуры дрожжей длится до 36 часов. Соответственно, динамика образования ГК₃ соответствует динамике накопления вторичных метаболитов в культурах грибов, когда синтез начинается в стационарной фазе и протекает линейно (Егоров, 2004) (рис 38).

Также стоит отметить, что все концентрации фитогормонов в культуральной жидкости в стационарной фазе роста не снижаются после достижения максимума вплоть до истечения срока 10 суток. В культурах других микроорганизмов зачастую наблюдается снижение концентрации гормонов с течением времени в стационарной фазе роста. По всей видимости, дрожжи не образуют ферменты, разрушающие растительные гормоны.

3.10. Дополнительные тесты

3.10.1 Фитогормональная активность дрожжей в микроаэрофильных условиях

В качестве объектов для данного исследования были взяты два вида - *Metschnikowia pulcherrima*, аскомицет, способный к брожению, а значит хорошо переносящий нехватку кислорода и *Pseudozyma hubeiensis*, базидиомицет, не способный к брожению, но являющийся типичным обитателем филлосферы (Nasanit et.al., 2016). Как оказалось, штамм № КБП У-6020 вида *Metschnikowia pulcherrima* в микроаэрофильных условиях практически не меняет темпов роста и к концу эксперимента набирает практически такую же биомассу, как и в условиях нормальной аэрации. Штамм № КБП У-5132 *Pseudozyma hubeiensis* при этом набрал менее трети от биомассы, получаемой в нормальных условиях (рис. 44).

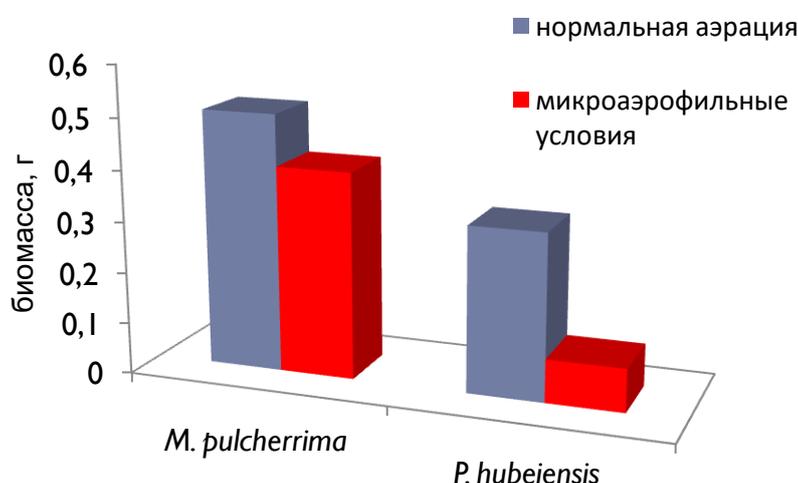


Рисунок 44. Накопление биомассы дрожжами в зависимости от условий аэрации

Фитогормональная активность на единицу биомассы при этом выросла незначительно для обоих штаммов (рис. 45-46). Но, если рассчитывать

концентрацию гормонов на объем среды, активность штамма КБП У-5132 понизилась в 3 раза.

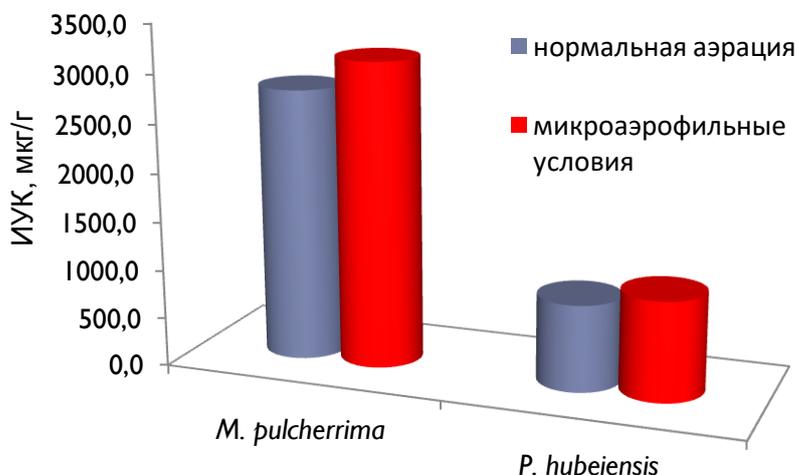


Рисунок 45. Зависимость интенсивности синтеза ИУК от условий аэрации

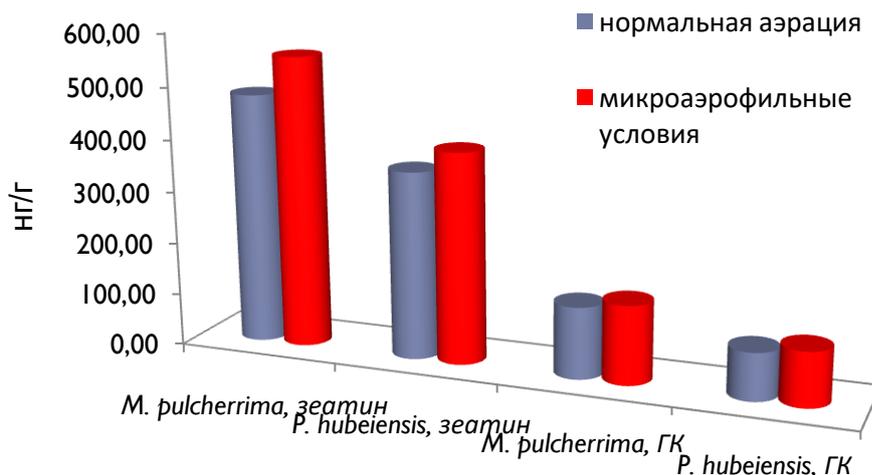


Рисунок 46. Зависимость интенсивности синтеза зеатина и ГК₃ от условий аэрации

Судя по всему, сохранение штаммом № КБП У-6020 темпов роста обусловлено переходом к брожению, в то время как штамм № КБП У-5132 не способен сбрасывать глюкозу и был вынужден перейти к замедленному метаболизму в условиях нехватки кислорода.

В целом, можно сказать, что дрожжи в микроаэрофильных условиях сохраняют способность синтезировать фитогормоны. Ограничением является только замедление роста и как следствие темпов синтеза у не бродящих

видов, к которым относится большинство базидиомицетов. Стоит отметить, что базидиомицеты зачастую обнаруживаются в тканях растений, а значит, нехватка кислорода не является для них критической.

3.10.2. Фитогормональная активность дрожжей при повышенной температуре

Данный тест был проведен, что бы узнать, как на синтезе фитогормонов дрожжами из разных отделов сказывается проведение экспериментов при стандартной температуре 20⁰С.

Как выяснилось, штамм № КБП У-6020, относящийся к аскомицетам, несколько повышал уровень синтеза фитогормонов при 25⁰С, но не более чем на 15-20%. В свою очередь базидиомицетовый штамм № КБП У-5132 наоборот, снижал фитогормональную активность при высокой температуре, но, опять-таки в пределах 15-20% (рис. 47-48).

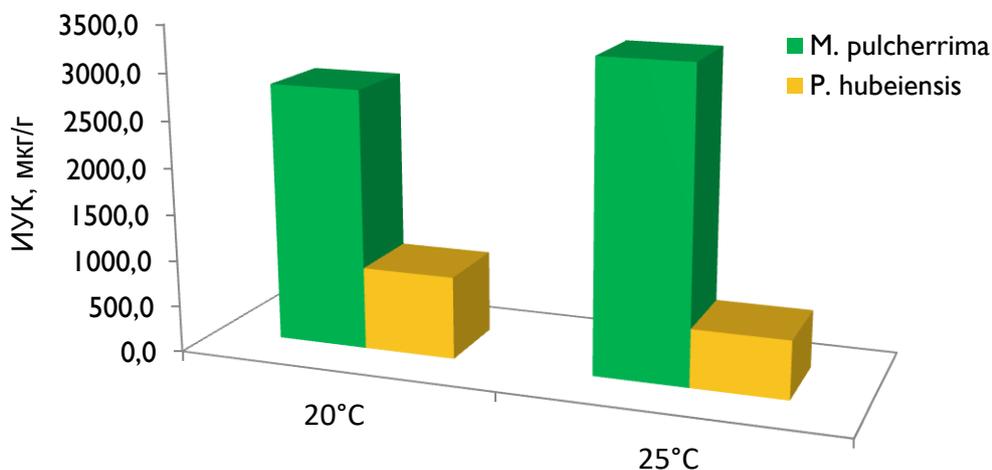


Рисунок 47. Зависимость интенсивности синтеза ИУК дрожжами от температуры

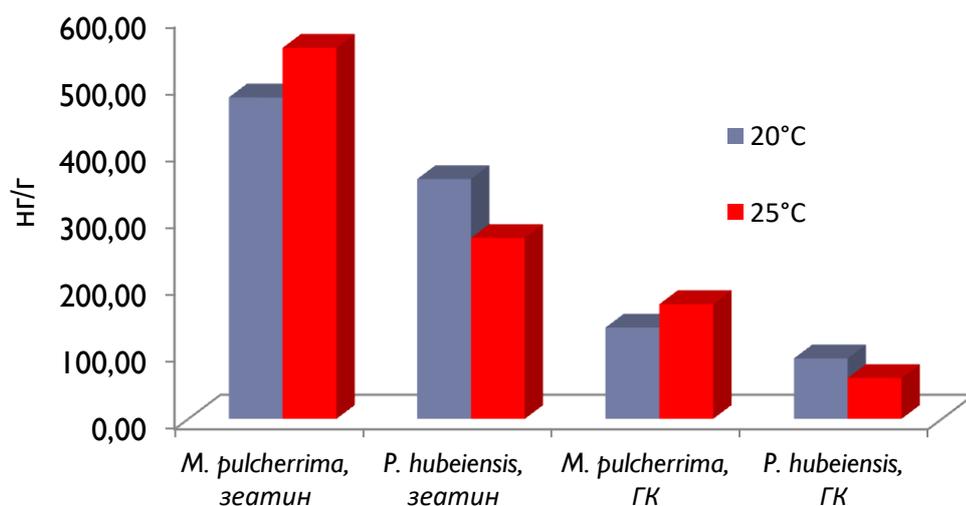


Рисунок. 48. Зависимость интенсивности синтеза зеатина и ГК₃ дрожжами от температуры

Соответственно, можно сделать вывод, что подобранная нами температура культивирования не оказывала существенного влияния на фитогормональную активность дрожжей.

Заключение

В результате проведенных исследований впервые удалось показать, что дрожжи из разных филогенетических и экологических групп способны к синтезу фитогормонов-стимуляторов, причем распространена эта способность довольно широко – 92% исследованных штаммов способны к синтезу ауксина, свыше 60% штаммов из выборки синтезировали зеатин, порядка 40% – гиббереллин. Также было показано, что ауксиновая активность встречается среди базидиомицетовых и аскомицетовых дрожжей с одинаковой частотой, в то время как исследования других авторов концентрировались только на аскомицетах. По средним значениям ауксигенной активности аскомицеты значительно опережают базидиомицетов. В то же время способность к синтезу зеатина среди базидиомицетовых дрожжей встречалась в два раза чаще. Нам удалось установить, что некоторые штаммы дрожжей синтезируют все три гормона-стимулятора одновременно, что предполагает их широкие возможности влияния на высшие растения. В целом, фитогормональная активность оказалась штаммовзависимым признаком, что подтверждается данными других авторов, исследовавших только ауксин.

Тем не менее, нам удалось продемонстрировать, что дрожжи, являющиеся сапротрофными анаморфами из подотделов *Taphrinomycotina* и *Ustilaginomycotina*, в среднем более активно синтезируют гормоны, что, по всей видимости, является следствием их эпифитного образа жизни и родственности фитопатогенам. При этом сами дрожжи данной группы патогенами не являются.

Фитогормональная активность коррелирует с климатогеографической приуроченностью штаммов: тропические штаммы наиболее активны в продуцировании ИУК, а штаммы арктико-альпийской зоны значимо активнее в синтезе зеатина и ГК₃. Предполагается, что это может быть связано с эволюционным отбором.

Также удалось показать, что баллистоспоровые дрожжи - типичные обитатели филлосферы - являются более активными продуцентами ауксина и зеатина, по сравнению с другими исследованными группами.

Выдвинуто предположение, что широкое распространение дрожжеподобных грибов *Aureobasidium pullulans* в филлосфере связано с их фитогормональной активностью. Данные дрожжи обладают сразу двумя важными для эпифитности свойствами: пектиназной активностью и поливариантной способностью к синтезу растительных гормонов.

Что касается субстратной приуроченности штаммов в отношении фитогормональной активности, то обнаружено, что существует тренд в сторону большей интенсивности синтеза у штаммов, выделенных с поверхности высших растений.

Были также проведены эксперименты с семенами культурных растений и оказалось, что дрожжи способны стимулировать прорастание семян и рост проростков. Среди эффектов наблюдались: ускорение прорастания, удлинение корня и стебля, а также увеличение сухой массы проростков. Причем, культуральная жидкость дрожжей с разным фитогормональным профилем оказывала различные эффекты.

Изучение динамики синтеза фитогормонов продемонстрировало, что синтез зеатина и ауксина идет пропорционально росту культуры, в то время как синтез гиббереллина, наоборот, начинается в стационарной фазе, как это характерно для вторичных метаболитов, в частности антибиотиков.

Чтобы смоделировать условия внутри растительных тканей, были проведены опыты в микроаэрофильных условиях и оказалось, что и аскомицетовые и базидиомицетовые дрожжи сохраняют фитогормональную активность при недостатке кислорода.

По итогам проделанной работы, можно утверждать, что роль дрожжей в экосистемах шире, чем обычно считается, и они могут, как и другие микроорганизмы, активно влиять на растительную компоненту биоценозов.

Также нужно отметить, что данная работа раскрывает новые подходы к созданию биопрепаратов на дрожжевой основе, базирующиеся на использовании явления фитогормональной активности.

Выводы

- 1) Впервые показано широкое распространение фитогормональной активности среди дрожжей: в исследуемой выборке свыше 90% штаммов синтезируют ауксин, 60% - зеатин, около 40% - гиббереллин. Некоторые штаммы способны к синтезу 3 гормонов одновременно.
- 2) Аскомицетовые дрожжи активнее синтезируют ауксин, также обнаружена связь фитогормональной активности и принадлежности некоторых дрожжей к сапротрофным анаморфным линиям фитопатогенов.
- 3) В рамках исследованной выборки выделенные в тропиках штаммы интенсивнее синтезируют ауксин, а штаммы из северных регионов более активны в образовании зеатина и гиббереллина.
- 4) Дрожжи стимулируют рост и развитие проростков культурных растений. Штаммы, различающиеся фитогормональным профилем, оказывают влияние на разные органы растений.
- 5) Динамика синтеза зеатина и ауксина характеризуется накоплением продукта пропорционально биомассе, в то время как синтез гиббереллина начинается в стационарной фазе роста, как характерно для вторичных метаболитов.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность Чернову Ивану Юрьевичу, своему научному руководителю со студенческой скамьи, за неоценимую помощь и всестороннюю поддержку в выполнении исследовательской работы.

Автор благодарит Качалкина Алексея Владимировича, научного сотрудника кафедры биологии почв за помощь в работе с коллекцией дрожжей и важные советы, касающиеся экспериментов и обработки данных.

Также автор благодарит Федотова Геннадия Николаевича за помощь в проведении экспериментов по влиянию дрожжей на прорастание пшеницы.

Список литературы

- 1) Абдуллабекова Д.А., Магомедова Е.С., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. Структура сообществ дрожжевых грибов виноградников в Дагестане //Микология и Фитопатология. – 2014. – Т. 48. – №2, – С. 78-83.
- 2) Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В, Гавриленко В.Ф. и др./Под ред. Ермакова И.П. Физиология растений. – М.: Изд-во «Academia», 2005, – 640с.
- 3) Архипова Т.Н., Шендель Г.В. Цитокинины продуцируемые ризосферными микроорганизмами, как регуляторы роста и стимуляции экссудации аминокислот растений твердой пшеницы //Агрехимия. – 2011. – №7. – С. 43-49.
- 4) Глушакова А.М. Экология эпифитных дрожжей. Дисс. ... канд. биол. наук. М. 2006. 146 с.
- 5) Глушакова А.М., Иванникова Ю.В. и др. Массовое выделение и идентификация дрожжей *Saccharomyces paradoxus* из филлосферы растений //Микробиология. – 2007. – Т.76. – №2. – С.1-7.
- 6) Глушакова А.М., Качалкин А.В., Желтикова Т.М., Чернов И.Ю. Дрожжевые грибы, ассоциированные с ветроопыляемыми растениями – ведущими пыльцевыми аллергенами в средней полосе России //Микробиология. – 2015. – Т. 84. – №5. – С. 612-615.
- 7) Глушакова А.М., Качалкин А.В., Максимова И.А., Чернов И.Ю. Дрожжи в млечном соке *Hevea brasiliensis* //Микробиология. – 2016. – Т. 85. – №4. – С. 466-471.
- 8) Глушакова А.М., Чернов И.Ю. Динамика дрожжевых сообществ в плодах шиповника (*Rosa canina* L.) //Микология и фитопатология. – 2009. – Т.43. – №3. – С.193-199.

- 9) Глушакова А.М., Чернов И.Ю. Сезонная динамика структуры сообществ эпифитных дрожжей //Микробиология. – 2010. – Т.79. – № 6. – С. 832-842.
- 10) Глушакова А.М., Чернов И.Ю. Сезонная динамика численности эпифитных дрожжей //Микробиология. – 2007. – Т.76. – №5. – С. 668-674.
- 11) Гэлстон А.Ю., Девис П., Сэттер Р. Жизнь зеленого растения. – М.: Мир, 1983, – 549с.
- 12) Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004, – 528 с.
- 13) Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. – М.: Наука. 1968, – 512с.
- 14) Заварзин Г. А. Лекции по природоведческой микробиологии /; Отв. ред. Н.Н. Колотилова; Ин-т микробиологии. - М.: Наука, 2003, – 348 с.
- 15) Исаева О.В. Экология эндофитных дрожжей. Дисс. ... канд. биол. наук. М. 2012. 105с.
- 16) Исаева О.В., Глушакова А.М., Гарбуз С.А., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. Эндофитные дрожжевые грибы в запасающих тканях растений//Известия РАН, сер. биологическая. – 2010. – №3. – С.34-43.
- 17) Исаева О.В., Глушакова А.М., Юрков А.М., Чернов И.Ю. Дрожжи *Candida railenensis* в плодах дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) //Микробиология. – 2009. – Т.78. – №3. – С.399–403.
- 18) Кефели В.И. Природные ингибиторы и фитогормоны. – М.: Наука, 1974, – 253 с.
- 19) Медведев С.С. Физиология растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004, – 336с.
- 20) Минеев В.Г., Сычев В.Г., Амелянчик О.А. и др./ под ред. академика РАСХН Минеева В.Г. Практикум по агрохимии. – М.: Изд-во МГУ, 2001, – 689с.

- 21) Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток /; пер. с английского Т.А. Петрова, И.Н. Позмозговой; под ред. И.Л. Работновой. – М.: Мир, 1978. – 259 с.
- 22) Уиттекер Р. Сообщества и экосистемы; пер. с английского Б.М. Миркин, Г.С. Розенберг. – М.: Прогресс, 1980, – 328 с.
- 23) Уоринг Ф., Филипс И. Рост растений и дифференцировка. – М.: Мир. 1984, – 512с.
- 24) Федотов Г.Н., Федотова М.Ф. Методика оценки посевных качеств семян // Роль почв в биосфере. Тр. Ин-та экологического почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. М.: Изд-во Моск. ун-та. – 2015. – №. 15. – С. 23–42.
- 25) Федотов Г.Н., Федотова М.Ф., Шалаев В.С., Батырев Ю.П. К вопросу о стимуляции прорастания семян с неглубоким покоем //Лесной вестник. – 2016. – № 1. – С. 147–157.
- 26) Физиология растений/ Полевой В.В. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.
- 27) Чайлахян М.Х., Бутенко Р.Г., Кулаева О.Н. и др. Терминология роста и развития высших растений. – М.: Наука, 1982, – 96с.
- 28) Чернов И.Ю. Дрожжи в природе. – М.:Товарищество научных изданий КМК, 2013, – 336 с.
- 29) Чернов И.Ю., Марфенина О.Е. Адаптивные стратегии грибов в связи с освоением наземных местообитаний Палеопочвы и индикаторы континентального выветривания в истории биосферы. Серия «Гео-биологические системы в прошлом». М.: ПИН РАН, 2010. С. 95–111.
- 30) Юсуфов А.Г. Эволюционная физиология растений/ 2-е изд., перераб. и доп.— М.: Высшая школа, 1996. — 255 с.
- 31) Якушкина Н.И., Бахтенко Е.Ю. Физиология растений. – М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2005, – 462с.

- 32) Abbas A. Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In: Querol A, Fleet G. (Eds. Yeasts in Food and Beverages)//Springer, Berlin, 2006, p.285–335.
- 33) Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities //Microbiological research. – 2008. – T. 163. – №. 2. – C. 173-181.
- 34) Akiyoshi D. E., Regier D. A., Gordon M. P. Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp //Journal of bacteriology. – 1987. – T. 169. – №. 9. – C. 4242-4248.
- 35) Al-Khayri J. M. Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) //Scientia horticultrae. – 2011. – T. 130. – №. 3. – C. 531-535.
- 36) Amprayn K. et al. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth //Applied Soil Ecology. – 2012. – T. 61. – C. 295-299.
- 37) Arkhipova T. N. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants //Plant and Soil. – 2005. – T. 272. – №. 1-2. – C. 201-209.
- 38) Arkhipova T. N. et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil //Plant and Soil. – 2007. – T. 292. – №. 1-2. – C. 305-315.
- 39) Atzorn R. et al. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots //Planta. – 1988. – T. 175. – №. 4. – C. 532-538.
- 40) Beech F. W., Davenport R. R. role of yeasts in cider-making //Rose, AH, and Harrison, JS eds. The yeasts. – 1970.
- 41) Begerow D., Schäfer A. M., Kellner R., Yurkov A., Kemler M., Oberwinkler F., Bauer R. Ustilaginomycotina // Systematics and Evolution. Berlin: Springer, 2014. V. 7 of The Mycota. P. 295–329.

- 42) Bhoire S. J., Nithya R., Loh C. Y. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of Sambung Nyawa [*Gynura procumbens*(Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds //Bioinformation. – 2010. – T. 5. – №. 5. – C. 191-197.
- 43) Bilkay I. S., Karakoç Ş., Aksöz N. Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger* //Turkish Journal of Biology. – 2010. – T. 34. – №. 3. – C. 313-318.
- 44) Breeze E. M., Dix N. J. Seasonal analysis of the fungal community on *Acer platanoides* leaves //Transactions of the British Mycological Society. – 1981. – T. 77. – №. 2. – C. 321-328.
- 45) Buzzini P., Martini A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments //Journal of applied microbiology. – 2002. – T. 93. – №. 6. – C. 1020-1025.
- 46) Celloto V. R. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by new *Klebsiella oxytoca* free and immobilized cells on inorganic matrices //The Scientific World Journal. – 2012. – T. 2012.
- 47) da Silva E. G. et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits //FEMS Yeast Research. – 2005. – T. 5. – №. 9. – C. 859-865.
- 48) Dobrev P. I., Kamínek M. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction //Journal of Chromatography A. – 2002. – T. 950. – №. 1. – C. 21-29.
- 49) Doty S. L. Endophytic yeasts: biology and applications //Symbiotic Endophytes. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – C. 335-343.
- 50) Egamberdieva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat //Acta Physiologiae Plantarum. – 2009. – T. 31. – №. 4. – C. 861-864.

- 51) El-Tarabily K. A., Sivasithamparam K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters //Mycoscience. – 2006. – T. 47. – №. 1. – C. 25-35.
- 52) Fleet G. Biodiversity and ecology of Australasian yeasts (fungi)//Australian Systematic Botany. – 2001. – T.14, – №3. – C.501-511.
- 53) Fonseca A., Inacio J. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer - Verlag, Berlin Heidelberg 2006, pp 263-301.
- 54) Fu S. F. et al. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab //Fungal biology. – 2016. – T. 120. – №. 3. – C. 433-448.
- 55) Ghosh A. C., Basu P. S. Growth behaviour and bioproduction of indole acetic acid by a Rhizobium sp. isolated from root nodules of a leguminous tree Dalbergia lanceolaria. – 2002.
- 56) Giannarelli S. et al. Comparative determination of some phytohormones in wild-type and genetically modified plants by gas chromatography–mass spectrometry and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry //Analytical biochemistry. – 2010. – T. 398. – №. 1. – C. 60-68.
- 57) Glickmann E., Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria //Applied and environmental microbiology. – 1995. – T. 61. – №. 2. – C. 793-796.
- 58) Gogala N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi //Cellular and Molecular Life Sciences. – 1991. – T. 47. – №. 4. – C. 331-340.
- 59) Hamayun M. et al. Gibberellin producing Neosartorya sp. CC8 reprograms Chinese cabbage to higher growth //Scientia Horticulturae. – 2011. – T. 129. – №. 3. – C. 347-352.

- 60) Han Z. et al. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of acid/alkaline phytohormones in grapes //Journal of Chromatography B. – 2012. – T. 881. – C. 83-89.
- 61) Hoyerová K. et al. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins //Phytochemistry. – 2006. – T. 67. – №. 11. – C. 1151-1159.
- 62) Hussain A., Hasnain S. Cytokinin production by some bacteria: its impact on cell division in cucumber cotyledons //African Journal of Microbiology Research. – 2009. – T. 3. – №. 11. – C. 704-712.
- 63) Ignatova L. V. et al. Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil //Microbiological research. – 2015. – T. 175. – C. 78-83.
- 64) Inácio J. et al. Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species //FEMS yeast research. – 2004. – T. 4. – №. 4-5. – C. 541-555.
- 65) Inácio J., Pereira P., Carvalho de M., Fonseca A., Amaral-Collaco M.T., Spencer-Martins I. Estimation and diversity of phylloplane microbiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal//Microbial Ecol. – 2002. – T.44. – №4. – C. 344-353.
- 66) Jaiboon K. et al. Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes //Mycological Progress. – 2016. – T. 15. – №. 7. – C. 755-770.
- 67) Jameson P.E., Morris R.O. Zeatin-like cytokinins in yeast: detection by immunological methods//Journal of plant physiology. – 1989. – T. 135. - №. 4. – C.385-390.
- 68) Jaroszuk-Ściseł J., Kurek E., Trytek M. Efficiency of indoleacetic acid, gibberellic acid and ethylene synthesized in vitro by *Fusarium culmorum*

- strains with different effects on cereal growth //Biologia. – 2014. – T. 69. – №. 3. – C. 281-292.
- 69) Jiang Y. et al. IAA-producing bacteria and bacterial-feeding nematodes promote *Arabidopsis thaliana* root growth in natural soil //European journal of soil biology. – 2012. – T. 52. – C. 20-26.
- 70) Karadeniz A., Topcuoğlu Ş. F., Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2006. – T. 22. – №. 10. – C. 1061-1064.
- 71) Karakoç Ş., Aksöz N. Some Optimal Cultural Parameters for Gibberellic Acid Biosynthesis by *Pseudomonas* sp //Turkish Journal of Biology. – 2006. – T. 30. – №. 2. – C. 81-85.
- 72) Khamna S. et al. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils //EurAsia J BioSci. – 2010. – T. 4. – C. 23-32.
- 73) Kinkel L (1991) Fungal community dynamics. In: Andrews JH, Hirano SS (eds) Microbial ecology of leaves. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 253–270
- 74) Kurtzman C., Fell J. (eds. The Yeasts, a taxonomic study). Fourth revised and enlarged edition. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1998, 1055p.
- 75) Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.) The Yeasts, a taxonomic study. 5th ed. New York: Elsevier, 2011. 2080 p.
- 76) Last F. T., Price D. Yeasts associated with living plants and their environs //The yeasts. – 1969. – T. 1. – C. 183-218.
- 77) Lata H. et al. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinacea plants using 16S rRNA sequencing //Plant cell, tissue and organ culture. – 2006. – T. 85. – №. 3. – C. 353-359.
- 78) Libkind D. et al. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation //FEMS microbiology ecology. – 2009. – T. 69. – №. 3. – C. 353-362.\

- 79) Limtong S. et al. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2014. – T. 30. – №. 6. – C. 1785-1796.
- 80) Limtong S., Koowadjanakul N. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – T. 28. – №. 12. – C. 3323-3335.
- 81) Loper J. E., Schroth M. N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet //Phytopathology. – 1986. – T. 76. – №. 4. – C. 386-389.
- 82) Ma Z., Ge L., Lee A. S.Y., Hong Yong J. W., Tan S. N., Ong E. S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction // Analytica Chimica Acta. - 2008. - T. 610. - №. 2. - P. 274-281.
- 83) Maruyama A., Maeda M., Simidu U. Occurrence of plant hormone (cytokinin)-producing bacteria in the sea //Journal of applied bacteriology. – 1986. – T. 61. – №. 6. – C. 569-574.
- 84) Merín M. G., Mendoza L. M., Morata de Ambrosini V. I. Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases //Journal of basic microbiology. – 2014. – T. 54. – №. 8. – C. 835-842.
- 85) Mishra R. R., Dickinson C. H. Phylloplane and litter fungi of *Ilex aquifolium* //Transactions of the British Mycological Society. – 1981. – T. 77. – №. 2. – C. 329-337.
- 86) Morris C.E. Phyllosphere. In: Encyclopedia of life sciences, 2001. Nature Publishing Group, London.

- 87) Nasanit R. et al. Yeast diversity and novel yeast D1/D2 sequences from corn phylloplane obtained by a culture-independent approach//Antonie van Leeuwenhoek. – 2016. – T. 109. - №.12 – C.1615-1634.
- 88) Nassar A. H., El-Tarabily K. A., Sivasithamparam K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots //Biology and Fertility of Soils. – 2005. – T. 42. – №. 2. – C. 97-108.
- 89) Novák O. et al. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry //Phytochemistry. – 2008. – T. 69. – №. 11. – C. 2214-2224.
- 90) Nutaratat P. et al. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand //Fungal biology. – 2014. – T. 118. – №. 8. – C. 683-694.
- 91) Oskaya M., Yalçınb H. T. Screening of Yeast Strains For Pectinolytic Activity: Effects Of Different Carbon And Nitrogen Sources In Submerged Fermentations //OnLine Journal of Biological Sciences. – 2015. – T. 15. – №. 3. – C. 89.
- 92) Pallai R. et al. Phytohormone production and colonization of canola (*Brassica napus* L.) roots by *Pseudomonas fluorescens* 6-8 under gnotobiotic conditions //Canadian journal of microbiology. – 2012. – T. 58. – №. 2. – C. 170-178.
- 93) Pan X., Wang X. Profiling of plant hormones by mass spectrometry //Journal of chromatography B. – 2009. – T. 877. – №. 26. – C. 2806-2813.
- 94) Prinsen E. et al. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids //FEBS letters. – 1991. – T. 282. – №. 1. – C. 53-55.
- 95) Raspor P., Zupan J. Yeasts in extreme environments. In: Peter G, Rosa C (Eds.) The yeast handbook//Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer, Berlin, 2006, p.371–417.

- 96) Reineke G. et al. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation //Molecular plant pathology. – 2008. – T. 9. – №. 3. – C. 339-355.
- 97) Rosa C.A., Peter G. (Eds.). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 579 p.
- 98) Russo G. et al. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio–Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina) //FEMS microbiology ecology. – 2008. – T. 65. – №. 3. – C. 415-424.
- 99) Sachdev DP., Chaudhari HG., Kasture VM., Dhavale DD., Chopade BA. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth//Indian J Exp Biol. – 2009. – T.47. – №12. – C.993-1000.
- 100) Shimada A. et al. Phytotoxicity of indole-3-acetic acid produced by the fungus, *Pythium aphanidermatum* //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2000. – T. 64. – №. 1. – C. 187-189.
- 101) Shokri D., Emtiazi G. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi design //Current microbiology. – 2010. – T. 61. – №. 3. – C. 217-225.
- 102) Spribille T. et al. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens //Science. – 2016. – T. 353. – №. 6298. – C. 488-492.
- 103) Staden J. Evidence for presence of cytokinins in malt and yeast extracts//Physiologia Plantarum. – 1974. – T.30. - №. 2. – C. 182-184
- 104) Stirk W. A. et al. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains1 //Journal of phycology. – 2013. – T. 49. – №. 3. – C. 459-467.
- 105) Tarkowski P. et al. Analytical methods for cytokinins //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2009. – T. 28. – №. 3. – C. 323-335.

- 106) Tien T. M., Gaskins M. H., Hubbell D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1979. – T. 37. – №. 5. – C. 1016-1024.
- 107) Tsavkelova E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2006. – T. 42. – №. 2. – C. 117-126.
- 108) Tsavkelova E. A., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots // *Microbiology*. – 2005. – T. 74. – №. 1. – C. 46-53.
- 109) Urbanová T. et al. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Talanta*. – 2013. – T. 112. – C. 85-94.
- 110) Xin G., Glawe D., Doty S. L. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees // *mycological research*. – 2009. – T. 113. – №. 9. – C. 973-980.
- 111) Zheng X. et al. Inhibiting *Penicillium expansum* infection on pear fruit by *Cryptococcus laurentii* and cytokinin // *Postharvest biology and technology*. – 2007. – T. 45. – №. 2. – C. 221-227.

Приложение 1

№	вид	Отдел	Подотдел	Регион	субстрат выделения
КБП У-5396	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Pezizomycotina</i>	Чукотка	поверхность мумии бизона
КБП У-5404	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Pezizomycotina</i>	Дагестан	почва под буковым лесом (0-10 см)
КБП У-5464	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Pezizomycotina</i>	Россия, Диксон	<i>Dryas punctata</i>
11-17	<i>Aureobasidium thailandense</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Pezizomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
11-18	<i>Aureobasidium thailandense</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Pezizomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
КБП У-3935	<i>Candida bombi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Geum rivale</i>
КБП У-3937	<i>Candida bombi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Лосинный остров	цветки чина луговая
КБП У-4532	<i>Candida cake</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	ил
КБП У-4809	<i>Candida cake</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Белое море, ББС МГУ	ил
4-1	<i>Candida heveicola</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	сок <i>Hevea brasiliensi</i>
7-1	<i>Candida heveicola</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	сок <i>Hevea brasiliensi</i>
21d	<i>Candida membranifaciens</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Дагестан	виноград
2-8	<i>Candida natalensis</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	соты <i>Apis mellifera</i>
11-29	<i>Candida natalensis</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
КБП У-4120	<i>Candida oleophila</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	галлы <i>Salix babylonica</i>
КБП У-4075	<i>Candida oleophila</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-3975	<i>Candida oleophila</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-4030	<i>Candida oleophila</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-4074	<i>Candida oleophila</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	цветки чины луговой
КБП У-4075	<i>Candida oleophila</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4120	<i>Candida oleophila</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	галлы <i>Salix babylonica</i>
КБП У-5475	<i>Candida trypodendroni</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	термиты <i>Nasutitermes sp.</i>
КБП У-3970	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-3920	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Galeobdolon luteum</i>

№	вид	Отдел	Подотдел	Регион	субстрат выделения
	<i>capitatum</i>				
КБП У-3970	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-4257	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва под <i>Impatiens parviflora</i>
КБП У-4316	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Красноярский край, Усть-Тарей	почва (0-10 см)
КБП У-5015	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	водоросли
КБП У-5357	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4518	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Москва	<i>Ceratophyllum demersum</i>
180k	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Сыктывкар	почва
111v	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Москва	<i>Potamogeton natans</i>
КБП У-4004	<i>Debariomyces hansenii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	подстилка
КБП У-4142	<i>Debariomyces hansenii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-4569	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Chamaedaphne calyculata</i>
КБП У-4033	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-5419	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	нитчатые водоросли
КБП У-4869	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, г. Фу Куонг	сок <i>Hevea brasiliensis</i> , застывший
КБП У-4129	<i>Filobasidium magnum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	<i>Sphagnum sp.</i>
КБП У-4668	<i>Filobasidium magnum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	ХМАО	<i>Ledum palustre</i>
КБП У-4807	<i>Filobasidium magnum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Белое море, ББС МГУ	<i>Odonthalia dentate</i>
КБП У-4534	<i>Filobasidium magnum</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	озеро, ил
КБП У-3928	<i>Filobasidium wieringae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-4251	<i>Filobasidium wieringae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens parviflora</i>
КБП У-3928	<i>Filobasidium wieringae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-4047	<i>Filobasidium wieringae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Carex sp.</i> , <i>Oxalis acetosella</i> , <i>Ajuga reptans</i>

№	вид	Отдел	Подотдел	Регион	субстрат выделения
КБП У-4251	<i>Filobasidium wieringae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья, <i>Impatiens parviflora</i>
КБП У-3991	<i>Goffeauzyma gastrica</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	корни <i>Impatiens glandulifera</i>
10к	<i>Goffeauzyma gastrica</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Брянская область	почва-подстилка (0-10 см)
22d	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Дагестан	виноград
13-7	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	кишки <i>Diplopoda</i>
15-20	<i>Metschnikowia koreensis</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
33-19	<i>Metschnikowia koreensis</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
КБП У-5623	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Россия, Дагестан	ягоды винограда культурного
КБП У-6020	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Россия, Дагестан	листья винограда культурного
КБП У-4163	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Geum rivale</i>
КБП У-4036	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Ajuga reptans</i>
КБП У-4197	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	цветы <i>Prunus padus</i>
КБП У-5016	<i>Metschnikowia zobeliai</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Белое море, ББС МГУ	морская звезда
КБП У-5088	<i>Metschnikowia zobeliai</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Белое море, ББС МГУ	<i>Ascophyllum nodosum</i>
КБП У-4781	<i>Mrakia aquatica</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Диксон	водоросли на почве
КБП У-4193	<i>Naganishia adeliensis</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens parviflora</i>
117v	<i>Naganishia vishniacii</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Москва	<i>Elodea canadensis</i>
33-23	<i>Papiliotrema flavescens</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
33-6	<i>Papiliotrema flavescens</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
1-26	<i>Papiliotrema laurentii</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
19d	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Дагестан	виноград
17d	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Дагестан	виноград
AP55	<i>Pseudozyma cf. aphidis</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ustilaginomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	плоды
16-10	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ustilaginomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы диптерокарпус
33-8	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ustilaginomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
35-7	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ustilaginomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	плоды

№	вид	Отдел	Подотдел	Регион	субстрат выделения
SH18	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ustilaginomycotina</i>	Шри-Ланка	растения
КБП У-5132	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ustilaginomycotina</i>	Шри-Ланка	растения
V75	<i>Pseudozyma sp.</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ustilaginomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
11-15	<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
28-3	<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
33-15	<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
КБП У-4125	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Geum rivale</i>
КБП У-3921	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Geum rivale</i>
КБП У-4126	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Республика Бурятия	злаки сухие
КБП У-3949	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Республика Бурятия	злаки сухие
КБП У-4081	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Монголия, Улан-Батор	листья ковыля
КБП У-4921	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Россия, Тверская обл.	<i>Sphagnum sp.</i>
592	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Россия, о. Шпицберген	<i>Deschampsia alpina</i>
965	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	<i>Carex limosa</i>
КБП У-3949	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Республика Бурятия	сухие злаки
КБП У-4125	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	цветки <i>Geum rivale</i>
КБП У-4169	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens parviflora</i>
КБП У-4170	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Москва	<i>Populus nigra</i> пораженный молью, листья
КБП У-4823	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	ил
КБП У-4556	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Марокко	почва (0-10 см)
КБП У-4535	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Мурманская обл.	море
КБП У-4722	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Красноярский край	почва (0-10 см)
КБП У-5007	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	респ. Коми	почва (0-10 см)
КБП У-4669	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Тверская обл.	<i>Sphagnum sp.</i>
КБП У-4996	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Мурманская обл.	море
КБП У-5419	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Диксон	плавун

№	вид	Отдел	Подотдел	Регион	субстрат выделения
КБП У-4528	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Марокко	почва (0-10 см)
КБП У-4533	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	<i>Potamogeton natans</i>
КБП У-4736	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Тверская обл.	<i>Sphagnum angustifolium</i>
473-2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Тверская обл.	<i>Sphagnum angustifolium</i>
473-2v	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Тверская обл., ЦЛГПБЗ	<i>Sphagnum angustifolium</i>
542a-1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	<i>Geum rivale</i>
КБП У-4737	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	<i>Chamaedaphne calyculata</i>
603-1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Норвегия, Шпицберген	поколы оленей
638-1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Московская обл.	<i>Drosera rotundifolia</i>
КБП У-4763	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	ХМАО	<i>Sphagnum magellanicum</i>
КБП У-5285	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	о.Бали	растения
КБП У-5300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Россия, Калужская обл.	почва на глубине 156см
КБП У-4748	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	<i>Sphagnum</i> sp.
149д	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Дагестан	виноград культурный
КБП У-5064	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Дагестан	виноград
КБП У-4511	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	корни <i>Carex limosa</i>
d1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Дагестан	виноград
КБП У-4114	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens glandulifera</i>
КБП У-4077	<i>Saitozyma podzolica</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4614	<i>Saitozyma podzolica</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Калужская обл.	почва на глубине 80см
441	<i>Solicoccozyma terreus</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4051	<i>Solicoccozyma terricola</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4196	<i>Solicoccozyma terricola</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4724	<i>Solicoccozyma terricola</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Красноярский край, Усть-Тарей	почва под <i>Trisetum sibiricus</i> (0-10 см)
КБП У-3960	<i>Solicoccozyma terricola</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4051	<i>Solicoccozyma terricola</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
КБП У-4068	<i>Solicoccozyma terricola</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)

№	вид	Отдел	Подотдел	Регион	субстрат выделения
КБП У-4329	<i>Solicoccozyma terricola</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Красноярский край, Усть-Тарей	почва (0-10 см)
11-13	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
1-20	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы
16-29	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	цветы <i>Dipterocarpus</i> sp.
КБП У-5105	<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Белое море, ББС МГУ	ил
328в	<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Диксон	растения
КБП У-5472	<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Россия, Диксон	растения
КБП У-5408	<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pucciniomycotina</i>	Белое море, ББС ЗИН РАН	водоросли
КБП У-5432	<i>Taphrina carpini</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Taphrinomycotina</i>	Россия, Диксон	растения
1525	<i>Taphrina</i> sp.	<i>Ascomycota</i>	<i>Taphrinomycotina</i>	Усть-Тарей	<i>Sphagnum</i> sp.
333v	<i>Taphrina</i> sp.	<i>Ascomycota</i>	<i>Taphrinomycotina</i>	Россия, Диксон	дриас
359v	<i>Taphrina</i> sp.	<i>Ascomycota</i>	<i>Taphrinomycotina</i>	Россия, Диксон	дриас
179k	<i>Tausonia pullulans</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Сыктывкар	почва
КБП У-5478	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	подстилка
5-5	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Вьетнам, Кат Тьен	кишки <i>Diplopoda</i>
КБП У-4200	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	листья <i>Impatiens parviflora</i>
КБП У-4273	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
352v	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Россия, Диксон	дриас
КБП У-4307	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycotina</i>	Памир, 1000-1500м	почва (0-10 см)
КБП У-4011	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Москва	почва (0-10 см)
КБП У-4049	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)
293	<i>Yamadazyma friedrichii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycotina</i>	Московская обл.	почва (0-10 см)

Приложение 2

№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГК ₃ , нг/г	№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГА, нг/г
КБП У-5396	<i>Aureobasidium pullulans</i>	115,3	39,4	51,0	V75	<i>Pseudozyma sp.</i>	800,0	349,6	нд
КБП У-5404	<i>Aureobasidium pullulans</i>	420,3	365,3	119,0	11-15	<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	785,8	6,8	7,2
КБП У-5464	<i>Aureobasidium pullulans</i>	670,7	0,0	52,0	28-3	<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	352,5	7,1	0,0
11-17	<i>Aureobasidium thailandense</i>	780,5	0,0	37,1	33-15	<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	339,1	10,0	0,0
11-18	<i>Aureobasidium thailandense</i>	2804,5	9,0	нд	КБП У-4125	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	196,0	нд	нд
КБП У-3935	<i>Candida bombi</i>	67,5	нд	нд	КБП У-3921	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	35,0	нд	нд
КБП У-3937	<i>Candida bombi</i>	35,5	нд	нд	КБП У-4126	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	47,8	нд	нд
4-1	<i>Candida heveicola</i>	1276,6	0,0	0,0	КБП У-3949	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	36,2	нд	нд
7-1	<i>Candida heveicola</i>	823,9	0,0	0,0	КБП У-4081	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	137,6	34,9	нд
21d	<i>Candida membranifaciens</i>	нд	0,0	нд	КБП У-4921	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	247,5	нд	нд
2-8	<i>Candida natalensis</i>	1470,6	0,0	0,0	592	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	395,0	40,4	нд
11-29	<i>Candida natalensis</i>	667,9	0,0	0,0	965	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	12,2	68,5	нд
КБП У-4120	<i>Candida oleophila</i>	15,6	нд	нд	КБП У-3949	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	47,7	нд	нд
КБП У-4075	<i>Candida oleophila</i>	6,4	нд	нд	КБП У-4125	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	126,7	нд	нд
КБП У-3975	<i>Candida oleophila</i>	0,0	нд	нд	КБП У-4169	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	29,8	нд	нд
КБП У-4030	<i>Candida oleophila</i>	14,9	нд	нд	КБП У-4170	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	40,9	нд	нд
КБП У-4074	<i>Candida oleophila</i>	12,8	нд	нд	КБП У-4823	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	322,2	нд	нд

№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГК ₃ , нг/г	№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГА, нг/г
КБП У-4075	<i>Candida oleophila</i>	0,0	нд	нд	КБП У-4556	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	115,8	нд	нд
КБП У-4120	<i>Candida oleophila</i>	6,7	нд	нд	КБП У-4535	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	69,6	нд	нд
КБП У-4532	<i>Candida sake</i>	23,2	нд	нд	КБП У-4722	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	229,8	нд	нд
КБП У-4809	<i>Candida sake</i>	23,2	нд	нд	КБП У-5007	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	498,5	354,8	нд
КБП У-5475	<i>Candida trypodendroni</i>	755,5	0,0	69,0	КБП У-4669	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	63,8	76,3	нд
КБП У-3970	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	321,8	нд	нд	КБП У-4996	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	101,6	нд	нд
КБП У-3920	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	54,8	нд	нд	КБП У-5419	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1139,1	22,5	8,0
КБП У-3970	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	76,6	нд	нд	КБП У-4528	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	475,9	63,9	нд
КБП У-4257	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	103,6	нд	нд	КБП У-4533	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	126,3	нд	нд
КБП У-4316	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0,0	нд	нд	КБП У-4736	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	237,8	49,6	нд
КБП У-5015	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	63,8	нд	нд	473-2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	133,8	нд	нд
КБП У-5357	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0,0	нд	нд	473-2v	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	134,0	43,3	нд
КБП У-4518	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	1100,9	187,4	6,0	542a-1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	546,0	38,5	нд
180k	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	нд	42,3	нд	КБП У-4737	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	626,8	112,0	нд
111v	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	нд	0,0	нд	603-1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,0	45,1	нд
КБП У-4004	<i>Debariomyces hansenii</i>	23,8	нд	нд	638-1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	63,5	нд	нд
КБП У-4142	<i>Debariomyces hansenii</i>	52,1	нд	нд	КБП У-4763	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	306,7	16,2	нд
КБП У-4569	<i>Debaryomyces hansenii</i>	2263,3	0,0	0,0	КБП У-5285	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	557,5	112,3	нд

№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГК ₃ , нг/г	№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГА, нг/г
КБП У-4033	<i>Debaryomyces hansenii</i>	27,3	нд	нд	КБП У-5300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1081,5	0,0	0,0
КБП У-5419	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1612,5	200,0	0,0	КБП У-4511	<i>Saccharomyces cerevsiae</i>	5061,0	0,0	0,0
КБП У-4869	<i>Debaryomyces hansenii</i>	3261,7	0,0	0,0	d1	<i>Saccharomyces cerevsiae</i>	нд	39,7	нд
КБП У-4129	<i>Filobasidium magnum</i>	9,2	нд	нд	КБП У-4114	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	2,0	нд	нд
КБП У-4668	<i>Filobasidium magnum</i>	514,4	47,3	0,0	КБП У-4748	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2873,2	0,0	60,0
КБП У-4807	<i>Filobasidium magnum</i>	0,0	нд	нд	149д	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,0	нд	нд
КБП У-4534	<i>Filobasidium magnum</i>	1401,8	0,0	0,0	КБП У-5064	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,0	нд	нд
КБП У-3928	<i>Filobasidium wieringae</i>	125,2	нд	нд	КБП У-4077	<i>Saitozyma podzolica</i>	9,2	нд	нд
КБП У-4251	<i>Filobasidium wieringae</i>	19,3	нд	нд	КБП У-4614	<i>Saitozyma podzolica</i>	3330,8	0,0	0,0
КБП У-3928	<i>Filobasidium wieringae</i>	133,8	нд	нд	441	<i>Solicoccozyma terreus</i>	14,7	нд	нд
КБП У-4047	<i>Filobasidium wieringae</i>	84,1	нд	нд	КБП У-4051	<i>Solicoccozyma terricola</i>	6,4	нд	нд
КБП У-4251	<i>Filobasidium wieringae</i>	18,6	нд	нд	КБП У-4196	<i>Solicoccozyma terricola</i>	114,0	нд	нд
КБП У-3991	<i>Goffeauzyma gastrica</i>	18,4	нд	нд	КБП У-4724	<i>Solicoccozyma terricola</i>	2325,0	0,0	0,0
10к	<i>Goffeauzyma gastrica</i>	58,4	нд	0,0	КБП У-3960	<i>Solicoccozyma terricola</i>	271,3	нд	нд
22d	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	нд	57,5	нд	КБП У-4051	<i>Solicoccozyma terricola</i>	169,4	нд	нд
13-7	<i>Kodamaea ohmeri</i>	1563,7	0,0	0,0	КБП У-4068	<i>Solicoccozyma terricola</i>	14,9	нд	нд
15-20	<i>Metschnikowia koreensis</i>	1713,7	0,0	0,0	КБП У-4329	<i>Solicoccozyma terricola</i>	19,4	нд	нд
33-19	<i>Metschnikowia koreensis</i>	931,6	0,0	0,0	11-13	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	479,1	24,6	0,0
КБП У-5623	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	7990,4	0,0	182,3	1-20	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	262,9	46,6	45,0

№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГК ₃ , нг/г	№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГА, нг/г
КБП У-5623	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	2803,9	480,2	136,4	16-29	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	3182,9	0,0	0,0
КБП У-4163	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	59,6	нд	нд	КБП У-5105	<i>Sporobolomyces roseus</i>	28,1	нд	нд
КБП У-4036	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	34,6	нд	нд	328в	<i>Sporobolomyces roseus</i>	988,3	789,7	0,0
КБП У-4197	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	13,2	нд	нд	КБП У-5472	<i>Sporobolomyces roseus</i>	1358,0	881,2	135,0
КБП У-5016	<i>Metschnikowia zobelii</i>	0,0	нд	нд	КБП У-5408	<i>Sporobolomyces roseus</i>	389,2	0,0	0,0
КБП У-5088	<i>Metschnikowia zobelii</i>	0,0	нд	нд	КБП У-5432	<i>Taphrina carpini</i>	434,0	61,0	100,0
КБП У-4781	<i>Mrakia aquatica</i>	395,0	95,8	нд	1525	<i>Taphrina sp.</i>	1009,0	275,9	0,0
КБП У-4193	<i>Naganishia adeliensis</i>	19,7	нд	нд	333v	<i>Taphrina sp.</i>	161,0	317,7	75,0
117v	<i>Naganishia vishniacii</i>	нд	0,0	нд	359v	<i>Taphrina sp.</i>	356,0	541,2	140,0
33-23	<i>Papiliotrema flavescens</i>	312,6	0,0	0,0	179k	<i>Tausonia pullulans</i>	нд	0,0	нд
33-6	<i>Papiliotrema flavescens</i>	255,2	0,0	0,0	КБП У-5478	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	2662,0	0,0	0,0
1-26	<i>Papiliotrema laurentii</i>	544,8	0,0	59,0	5-5	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	2484,5	0,0	0,0
19d	<i>Pichia guilliermondii</i>	нд	0,0	нд	КБП У-4200	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	5,2	нд	нд
17d	<i>Pichia kudriavzevii</i>	нд	0,0	нд	КБП У-4273	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	14,2	нд	нд
AP55	<i>Pseudozyma cf. aphidis</i>	511,0	13,8	нд	352v	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	299,0	338,1	нд
16-10	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	598,9	0,0	32,0	КБП У-4307	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	1,1	нд	нд
33-8	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	1317,3	0,0	0,0	КБП У-4011	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	22,6	нд	нд
35-7	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	1072,6	6,4	0,0	КБП У-4049	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	42,8	нд	нд
SH18	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	450,0	53,4	71,0	293	<i>Yamadazyma friedrichii</i>	20,1	нд	нд

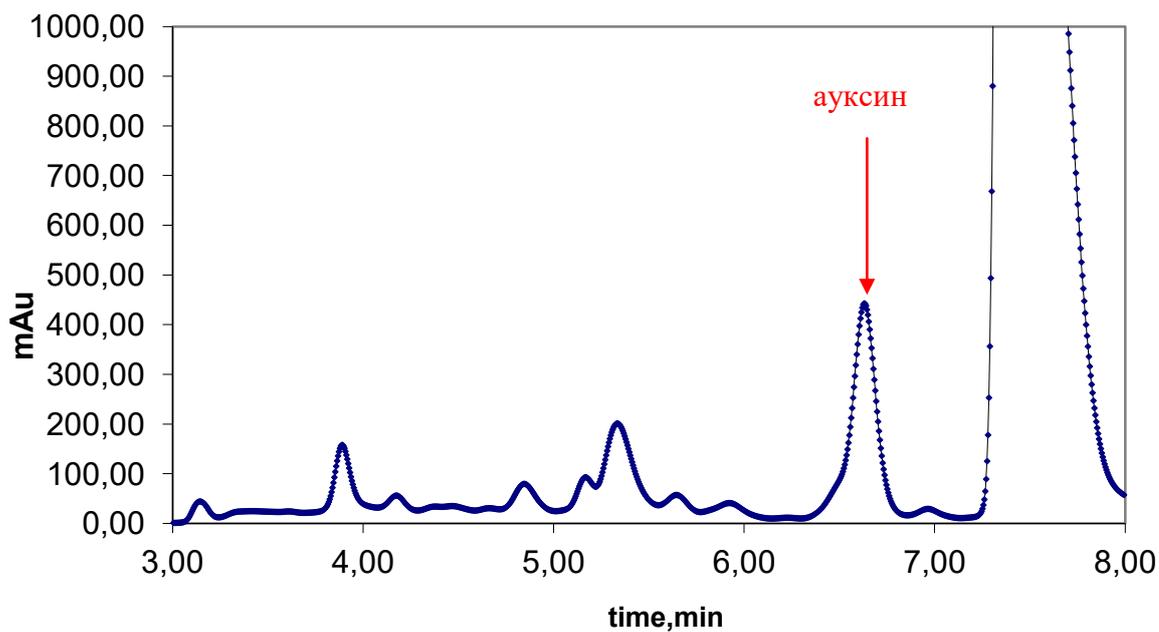
№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГК ₃ , нг/г	№	вид	ауксин, мкг/г	зеатин нг/г	ГА, нг/г
КБП У-5132	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	890,0	358,3	90,0					

Приложение 3

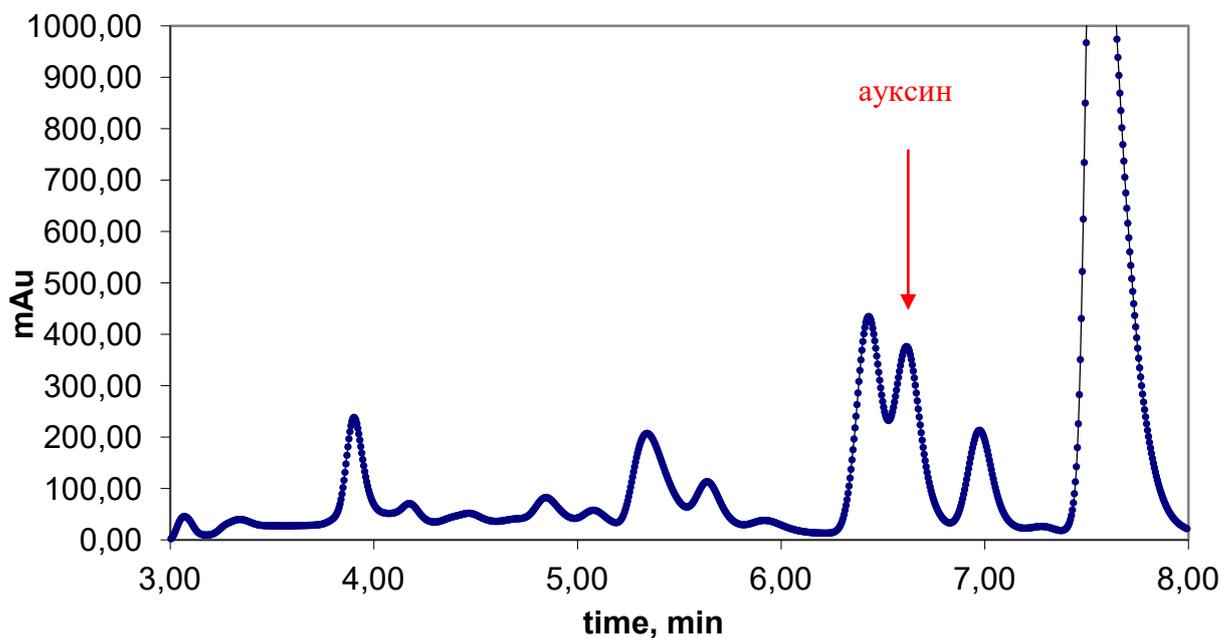
ВИД	пигментация	баллистоспоры	утилизация крахмала	рост без витаминов	брожение (глюкоза)	брожение (галактоза, сахароза)
<i>Candida bombi</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Candida heveicola</i>	-	-	-	+	+	v
<i>Candida membranifaciens</i>	-	-	v	-	+	-
<i>Candida natalensis</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Candida oleophila</i>	-	-	v	-	+	-
<i>Candida sake</i>	-	-	-	v	v	-
<i>Candida trypodendroni</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	+	-	+	-	-	-
<i>Cystofilobasidium infirmominatum</i>	+	-	+	-	-	-
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Debariomyces hansenii</i>	-	-	v	-	-	-
<i>Filobasidium magnum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Filobasidium wieringae</i>	-	-	v	-	-	-
<i>Goffeauzyma gastrica</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Metschnikowia koreensis</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Metschnikowia zobellii</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Mrakia aquatica</i>	-	-	+	-	w	-
<i>Naganishia adeliensis</i>	-	-	+	+	-	-
<i>Naganishia vishniacii</i>	-	-	v	+	-	-

ВИД	пигментация	баллистоспоры	утилизация крахмала	рост без витаминов	брожение (глюкоза)	брожение (галактоза, сахараза)
<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	-	v	+	-	-
<i>Papiliotrema laurentii</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	-	-	+	+	-
<i>Pseudozyma cf. aphidis</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	-	-	w	+	-	-
<i>Pseudozyma sp.</i>	-	-	w	+	-	-
<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	-	-	-	-	+	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	+	v
<i>Saitozyma podzolica</i>	-	-	+	v	-	-
<i>Solicoccozyma terreus</i>	-	-	v	+	-	-
<i>Solicoccozyma terricola</i>	-	-	+	+	-	-
<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Taphrina carpini</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Taphrina sp.</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Taphrina sp.</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Taphrina sp.</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Tausonia pullulans</i>	-	-	+	v	-	-
<i>Torulaspota pretoriensis</i>	-	-	-	+	+	v
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	+	+	+	v
<i>Yamadazyma friedrichii</i>	-	-	-	-	+	-

Приложение 4

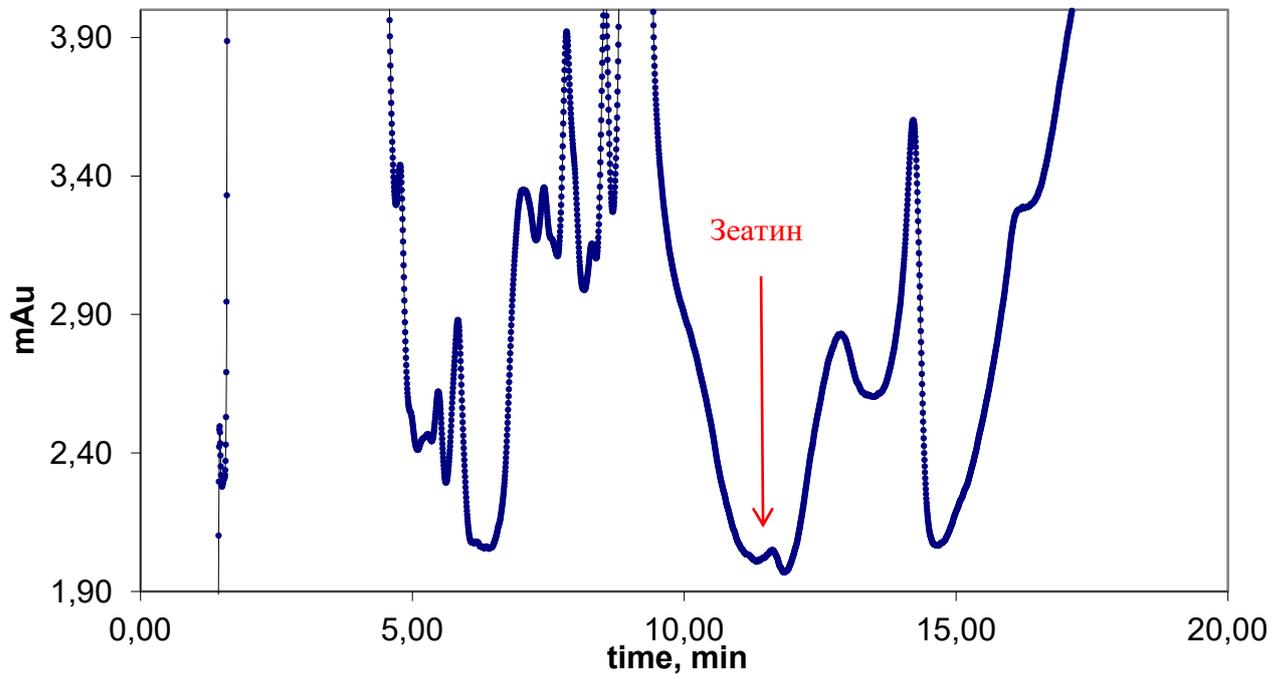


Хроматограмма культуральной жидкости штамма № KBP Y-3960 (ВЭЖХ-УФ, 222 нм), сконцентрировано 20 мл культуральной жидкости при помощи экстракции этиацетатом



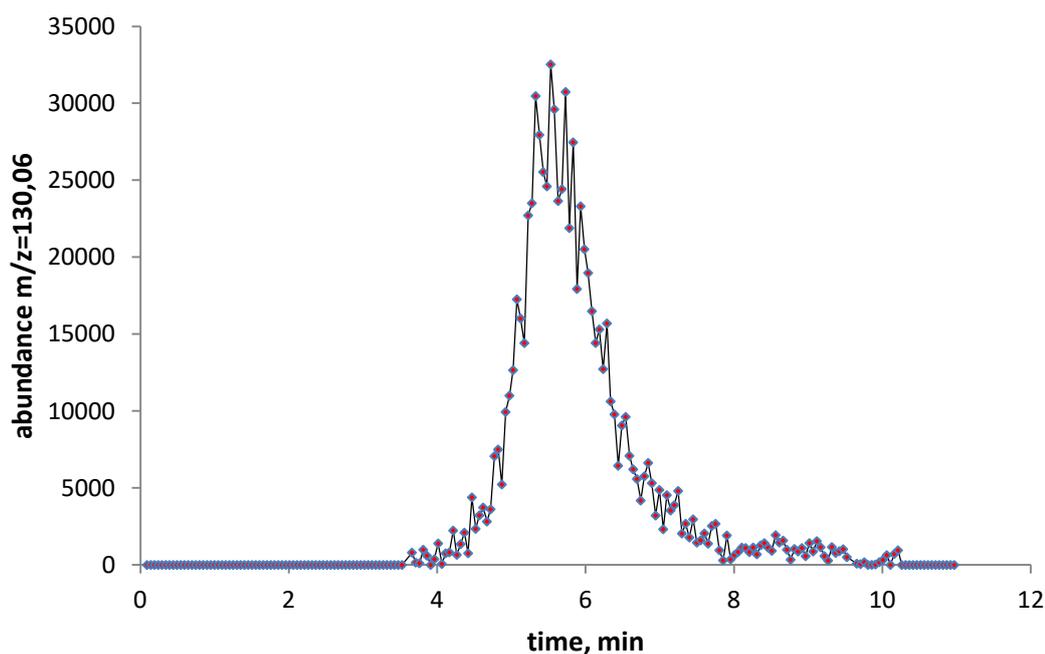
Хроматограмма культуральной жидкости штамма № KBP Y-4518 (ВЭЖХ-УФ, 222 нм), сконцентрировано 20 мл культуральной жидкости при помощи экстракции этиацетатом

Приложение 5

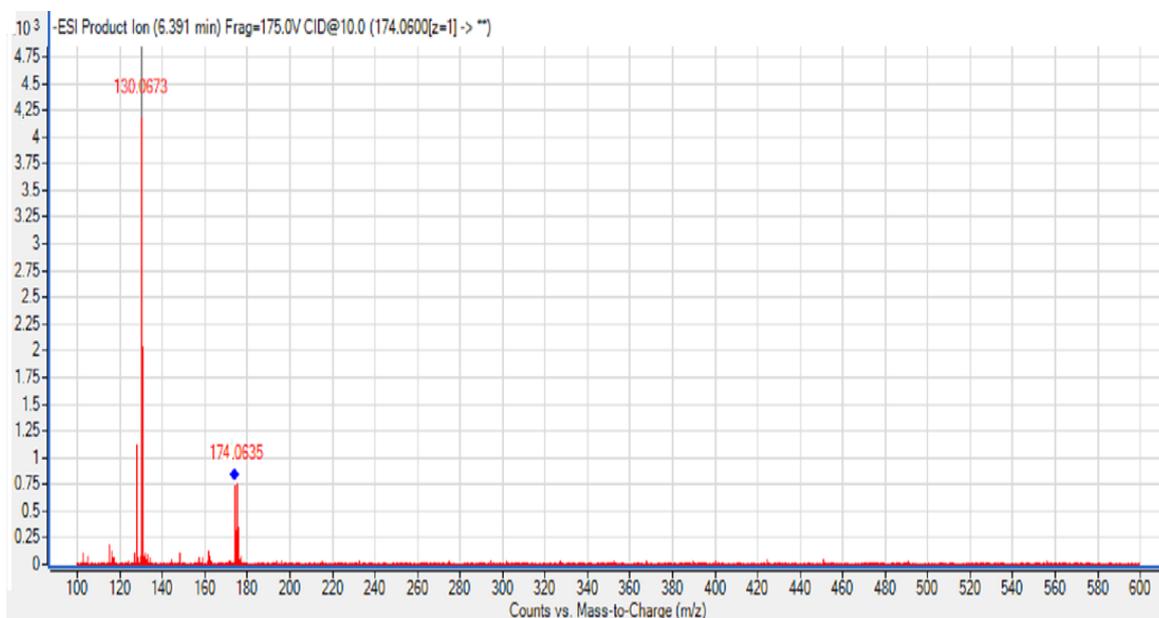


Хроматограмма культуральной жидкости штамма № КБП У-5623 (ВЭЖХ-УФ, 254 нм), сконцентрировано 100 мл культуральной жидкости при помощи лиофилизации

Приложение 6

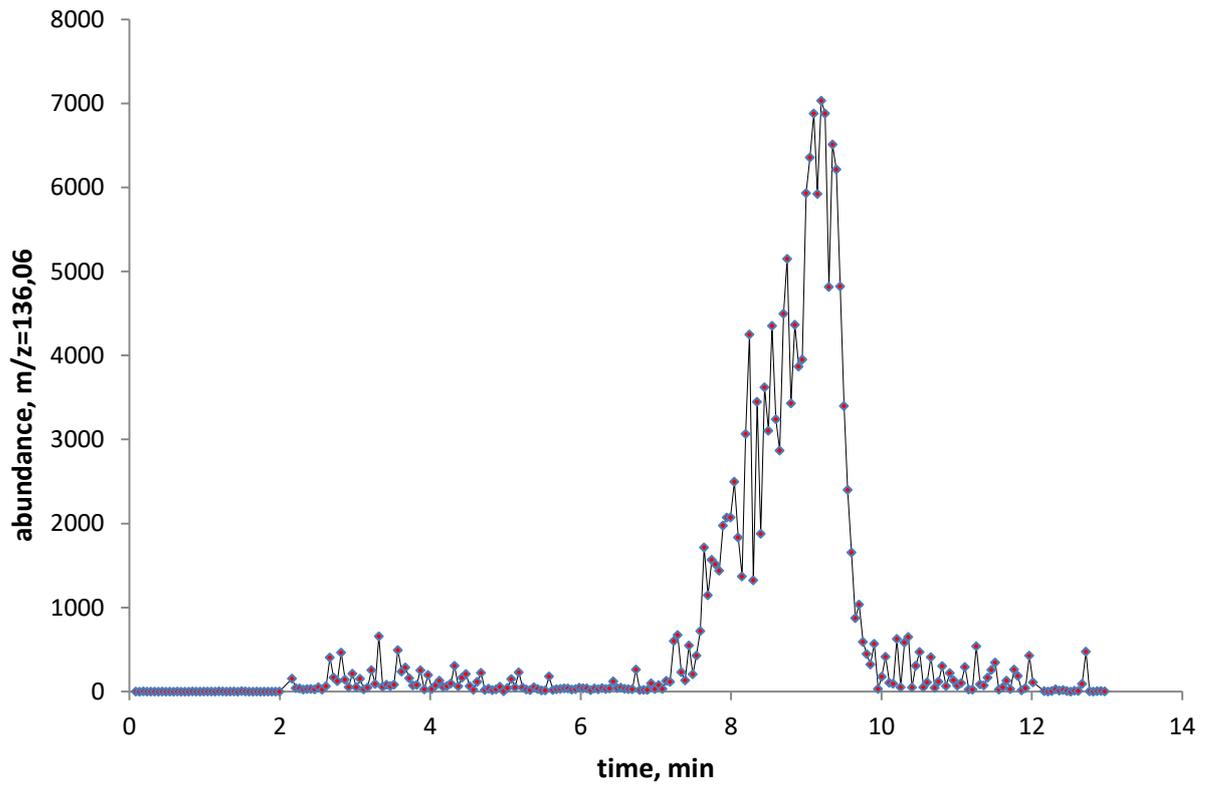


Хроматограмма культуральной жидкости штамма № КБП У-4668, ауксин (ВЭЖХ-МС/МС, $m/z=130,06$), ТФЭ из 50 мл культуральной жидкости, экстракт разведен в 100 раз)

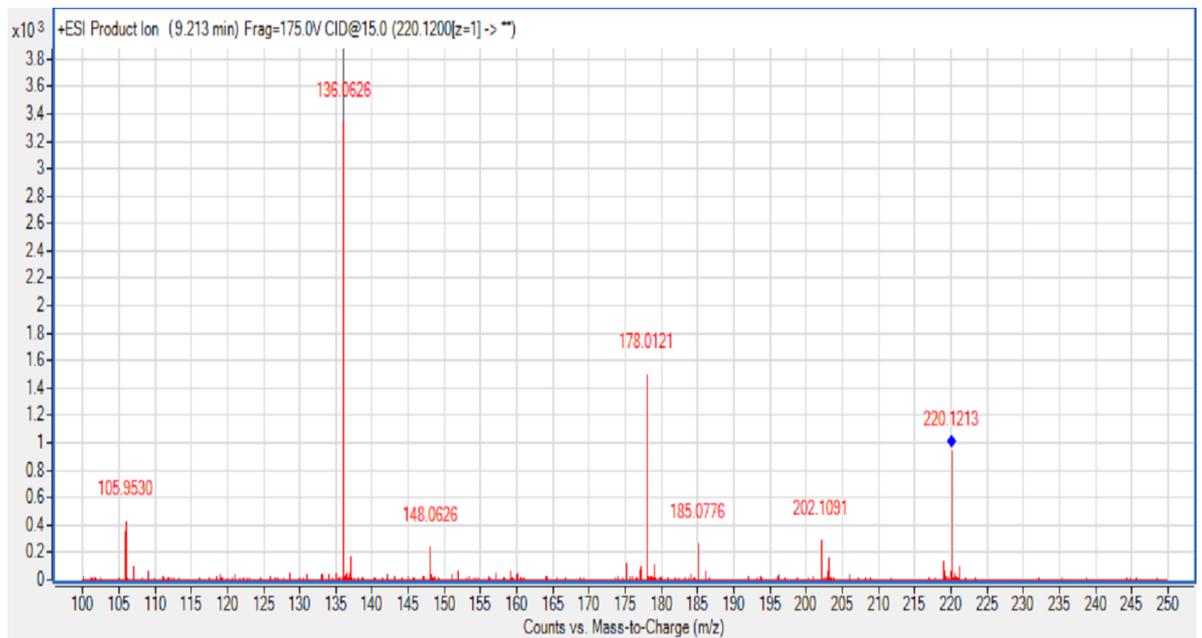


Масс-спектр ауксина (культуральная жидкость штамма № КБП У-4668)

Приложение 7

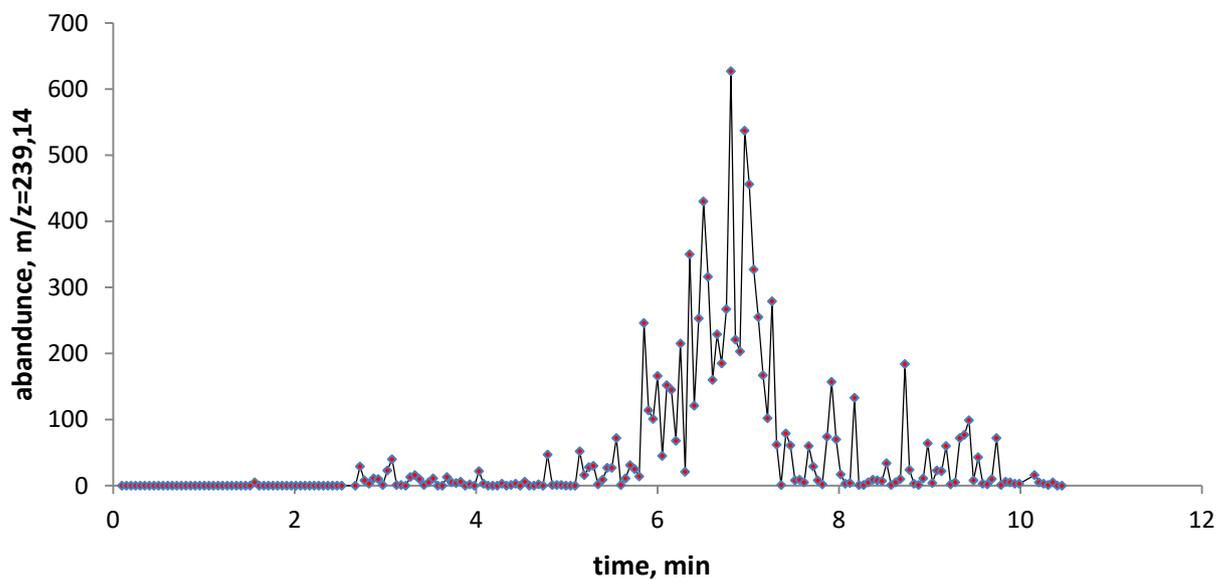


Хроматограмма культуральной жидкости штамма № КБП У-5132, зеатин (ВЭЖХ-МС/МС, $m/z=136,06$), ТФЭ из 50 мл культуральной жидкости

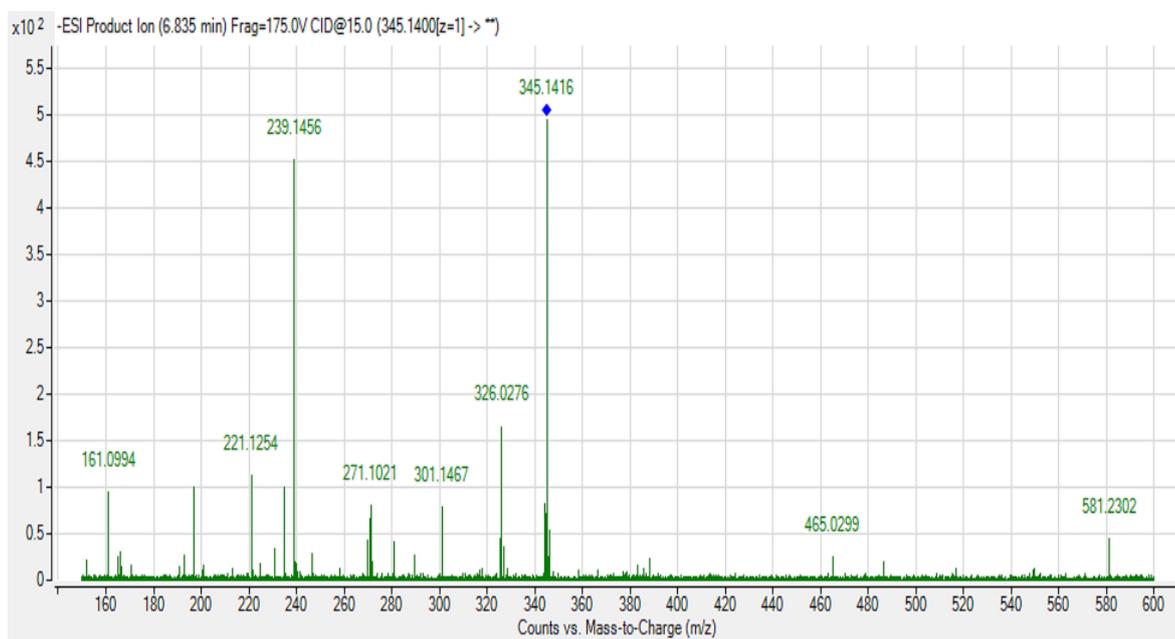


Масс-спектр зеатина (культуральная жидкость штамма № КБП У-5132)

Приложение 8



Хроматограмма культуральной жидкости штамма № КБП У-5472, гиббереллин (ВЭЖХ-МС/МС, $m/z=239,14$), ТФЭ из 50 мл культуральной жидкости



Масс-спектр гиббереллина (культуральная жидкость штамма № КБП У-5472)