

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2022 р.

ВПЛИВ БАКТЕРІЛЬНИХ СИГНАЛЬНИХ МОЛЕКУЛ КЛАСУ
АЦИЛСОМОСЕРИН ЛАКТОНІВ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ
ОСОБЛИВОСТІ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА УМОВ
МОДЕЛЬОВАНОГО КИСЛОТНОГО ДОЩУ

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Високі технології (Біотехнологія)»
Устименко Софії Олександрівни

Науковий керівник
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
Олексій Юрійович Нипорко

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	6
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	16
РОЗДІЛ 3. ВИСНОВКИ	31
Список використаної літератури	32

РЕФЕРАТ

Дана дипломна робота присвячена вивченню впливу сигнальних бактеріальних молекул класу Ацилгомосерин лактонів на рослини озимої пшениці сортів Подолянка та Спельта. Зацікавленість була саме в тому, чи допоможе праймування пшениці N-гексаноіл-L-гомосерин лактоном вижити культурі за умов кислотних дощів. Було порівняно розвиток рослин, продуктивність та структуру врожайності для двох українських сортів озимої пшениці Спельта та Подолянка. Праймування пшениці данним способом продемонструвало покращення врожайності протягом двох вегетаційних сезонів. Було підтверджено епігенетичний ефект від покоління F1.

Дипломна робота складається із вступу, 3 розділів, 7 малюнків, 18 таблиць, списку використаних джерел (30 найменувань).

Ключові слова: Ацилгомосерин лактон, озима пшениця, праймування, врожайність.

ВСТУП

Вже протягом декількох мільйонів років існує співіснування між рослинами та бактеріями. Складна взаємодія рослин у власній фітосфері (ендо-, філо-, ризосфер) із мікробною популяцією- має суттєве значення. Від цієї взаємодії залежить засвоєння рослинами поживних речовин, їх розвиток і стабільність. Ефективність співіснування виявляється не безпосередньо, зокрема, особливими комунікаційними системами – рослин і мікроорганізми використовують сигнальні шляхи, які реалізуються послідовно на індивідуальному позаклітинному та внутрішньоклітинному рівнях.

В даний час відомо лише декілька типів молекул медіаторів що можна використовувати для дистанційної передачі сигналів. Найбільш вивченою з них є сигнальна система в якій беруть участь молекули лактонної групи ацилгомосерину, менш вивченими є гетероциклічні сполуки азоту, а також гідроксикетони та системи пептидної природи [8, 43]. Таким чином, одним із медіаторів сигнальної системи бактеріального фітосферно-рослинного співтовариства є лактони ацилгомосерину.

Медіатори АГЛ, ймовірно, становлять найбільшу групу речовин, які беруть участь у передачі сигналів від мікробів до макроорганізмів. Зростаючий вплив негативного людського фактора на навколишнє середовище ставить перед дослідниками та аграрними науковцями задачу щодо скорочення або припинення використання синтетичних пестицидів. Однак питання ефективного захисту посівів від шкідників і хвороб залишається невирішеним. Тому для забезпечення зростаючого попиту на харчові продукти необхідно розвивати сучасні біотехнології захисту рослин для підвищення кількості та якісних показників продукції біобезпечним способом.

Актуальністю є те, що пшениця є одним з найважливіших продуктів харчування та експортних товарів в Україні, причому ~95% урожаю отримують від посівів озимої пшениці [1]. Озима пшениця становить ~95% однорічного врожаю, а решта 5% посівається як яра [2]. Зазвичай його висівають восени (вересень-жовтень) і збирають у середині літа (липні) наступного року, однак погодні умови сильно впливають на якість врожаю, а часті зміни протягом вегетаційного періоду роблять його більш сприйнятливим до бактерій та грибкових збудників, ніж яра пшениця, яка вирощується з квітня по серпень. Незважаючи на те, що існує ряд інтенсивних сільськогосподарських технологій для підвищення врожайності та боротьби з патогенами, в економіці виробництва пшениці домінує необхідність утримувати вхідні кошти за межі передпосадкової бактерицидної та фунгіцидної обробки та внесення добрив на низькому рівні, щоб бути економічним [3]. Тому існує потреба доповнити існуючі виробничі практики економічними, але ефективними обробками насіння для підвищення врожайності та стійкості до патогенів

Метою роботи огляду були аналіз та узагальнення літературних відомостей про ацилцетилсеринлактони — важливий клас молекул-медіаторів бактеріального походження, задіяних у дистанційній трансдукції сигналів, їх роль у регуляції фізіологічних процесів рослинних організмів, перспективи використання у біотехнологічних розробках, спрямованих на підвищення стресостійкості і врожайності аграрних культур.

Новизною є те, що запропонований метод праймування пшениці показав досить високу результати стійкості рослин озимої пшениці сорту Спельти та Подолянки. Винахід показав підвищення врожайності до 41-94% в умовах обробки на стадії насіння, а в умовах фолірної обробки підвищення врожайності на 11% більше, ніж за умови обробки насіння.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Міжклітинна комунікація мікроорганізмів.

Упродовж тривалого часу бактерії розглядали і досліджували виключно як індивідуальні одноклітинні організми, в яких відсутня надклітинна організація. На сьогодні загально визнано, що основною формою існування бактерій у природних умовах є популяційне надклітинне угруповання, часто асоційоване з поверхнею субстрату [4, 5]. Такі угруповання отримали назву біоплівки, і вони є високопорядкованими бактеріальними утвореннями, екологічною нішею, штучно створеною бактеріями, де вони підтримують стабільні умови існування, формують складні трофічні потоки. У біоплівках бактерії координують і синхронізують роботу індивідуальних геномів, що, відповідно, дає популяції можливість функціонувати подібно багатоклітинному організму [4]. Традиційно біоплівкою вважають структури, прикріплені до абіотичних і біотичних поверхонь та занурені в рідину. Проте багато біоплівок, зокрема утворювані фітобактерією *Pseudomonas fluorescens* SBW25, є такими, що формуються на поверхні рідкого субстрату. Уперше біоплівки було виявлено в природних екосистемах, але наразі беззаперечним є факт їхнього існування в усіх еконішах, зокрема й у антропосфері. Біоплівки утворюються в кілька етапів, а саме: адгезія клітин на поверхні; формування так званих мікроколоній — первинних клітинних угруповань; перерозподіл клітинної маси; активний поділ клітин для створення клітинних кластерів; формування екзополімерного слизового матриксу, вивільнення бактерій з угруповання, перехід від прикріпленої до вільної (планктонної) форми існування, подальша колонізація нових еконіш (рис. 1).[9]

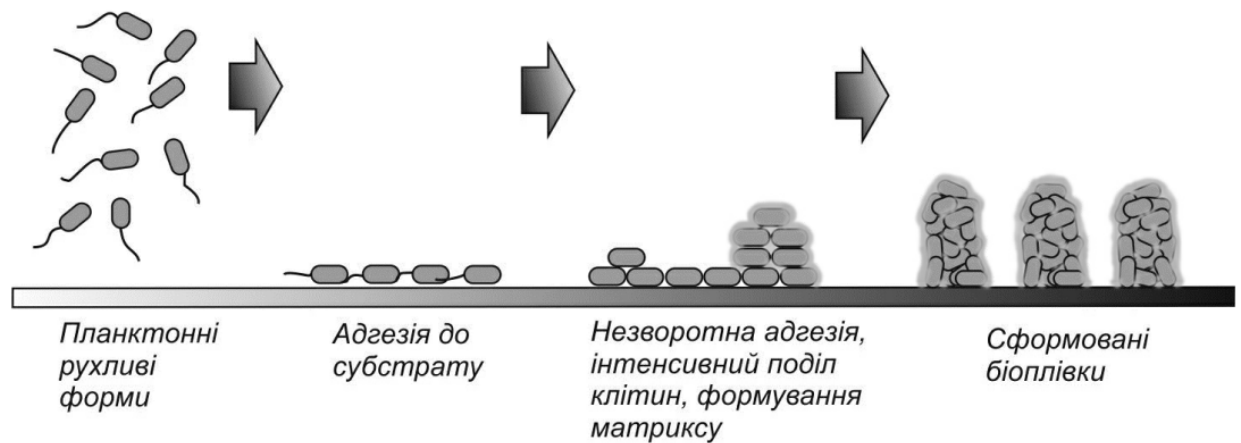


Рис. 1. Послідовність етапів формування бактеріальної біоплівки

За допомогою конфокальної та електронної мікроскопії встановлено, що біоплівки мають складну тривимірну структурну організацію.

Після незворотної адгезії популяція бактерій починає інтенсивно ділитись з утворенням багатоклітинних шарів і активно синтезувати компоненти екзополімерного матриксу, що є одним із ключових моментів утворення біоплівок. Клітини у слизовому матриксі розміщуються не хаотично, а впорядковано, відповідно до певних структурних принципів.[30]

Матрикс розділений каналами, наповненими водними розчинами. Через ці канали транспортуються поживні речовини і проходить кисень від зовнішніх до внутрішніх шарів біоплівки, а також виводяться метаболіти. В останні роки зібрано чимало даних, які підтверджують здатність бактерій — членів популяції біоплівки — виявляти координовану активність, що, як вважали раніше, є прерогативою багатоклітинних організмів. Взаємодія окремих клітин у бактеріальній популяції необхідна для її виживання в мінливих екологічних умовах і встановлення симбіотичних або паразитарних взаємовідносин із багатоклітинними організмами.[8]

Загально-біологічна роль біоплівок полягає у виживанні й адаптації в мінливому навколишньому середовищі, зокрема у процесі колонізації, захисті від токсинів та організмів, що використовують бактерії як харчовий

субстрат, а також у патогенезі. Координована діяльність бактеріальних клітин у біоплівці здійснюється за допомогою спеціалізованих хімічних молекул — комунікативних медіаторів, або аутоіндукторів (AI), названих так через здатність стимулювати власний біосинтез. Сигнальні молекули-аутоіндуктори фактично є регуляторами генної експресії. Вони вільно дифундують крізь клітинні мембрани, створюють умови, за яких бактеріальна клітина набуває здатності реагувати на будь-які зміни їх внутрішньоклітинної концентрації, що відповідає концентрації AI у водній фазі біоплівки, і таким чином реагують на зміну розмірів популяції. Таку своєрідну сенсорну міжклітинну взаємодію, яка забезпечує ауторецепцію кількісних параметрів популяції, в англійській науковій літературі називають «quorum sensing» (QS) — «відчуження» кворуму [6]. На сьогодні QS-регуляцію виявлено більш як у 500 видів бактерій. QS-система об'єднує механізми трансляції, рецепції та координації медіаторами QS-сигналів активності генів, серед яких такі, що забезпечують індивідуальні переваги окремим членам популяції за умови досягнення необхідного кількісного рівня бактеріальної взаємодії. Бактерійні QS-системи з певними припущеннями можна вважати найдревнішим прототипом складних регуляторних систем вищих організмів (гормональної та імунної), що використовують медіатори для координації функцій різноманітних типів клітин із метою досягнення адекватної адаптаційної реакції на рівні тканин, органів та організму в цілому [7]. Одним із перших об'єктів, на яких дослідили явище QS, була бактерія *Vibrio fischeri*, що живе у фотофорах — органах тихоокеанського кальмара, які продукують світло. Взаємодія цих організмів — приклад взаємовигідного співіснування видів, які належать до різних царств.

Активний уночі молюск отримує перевагу, оскільки світіння, спричинюване бактеріями, робить його непомітним у воді, маскує у місячному світлі від хижаків. У свою чергу, бактерії отримують від молюска живлення й укриття. З'ясувалось, що здатність колонізувати фотофори кальмарів визначає

бактеріальний ген *rscS*, який кодує білок рецептор, розміщений на клітинній мембрані, реагує на зовнішні сигнали, передаючи їх всередину клітини, та активує інший регуляторний білок — транскрипційний фактор *SypG*. У свою чергу, *SypG* активує групи генів, які кодують білки, необхідні для синтезу полісахаридів, що виводяться з бактеріальної клітини [13]. Ці полісахариди сприяють поділу бактерій у слизовому середовищі фотофору. Якщо *V. fischeri* існує у вигляді планктонних форм, речовина-аутоіндуктор знаходиться у низькій концентрації і люмінесценція відсутня. Зростання ж кількості клітин до 10¹¹ шт/мл викликає біолюмінесценцію у світному органі кальмара.

Подібно до *V. fischeri* відбувається QS у бактерій роду *Erwinia* (*E. carotovora* та *E. chrysanthemi*), які спричинюють м'яку гниль картоплі і хризантем, гідролізуючи клітинні стінки рослин пектиназою і целюлазою. Утворення цих ферментів є важливим чинником вірулентності *Erwinia* і залежить від кількості клітин у популяції [14, 15]. Тому за досить високої щільності популяції бактерій ферменти синтезуються настільки інтенсивно, що клітини рослин руйнуються раніше, ніж імунна система встигає відреагувати на проникнення патогену. Отже, QS базується на складній ієрархічній регуляції цільових локусів геному бактеріальної клітини, яка здійснюється на транскрипційному, трансляційному і посттрансляційному рівнях [16]. Система QS регулює утворення біоплівки, перенесення плазмід, синтез антибіотиків, споруляцію у бактерій. QS можна порівняти з гормональною регуляцією функціональної активності різних органів і тканин у багатоклітинному організмі. Загальна кількість генів, контрольованих системою QS, у різноманітних бактеріальних видів становить від 5 до 25 %. Молекули-аутоіндуктори. Доведено, що синхронізація поведінки бактерій у біоплівці реалізується через використання медіаторів QS, або аутоіндукторів [13].

1.2 Ацилгомосерин лактон

Ацилгомосеринлактони (АГЛ) - клас молекул медіаторів, що координують активність клітин у популяції грамнегативних бактерій. АГЛ синхронізують індивідуальні клітинні геноми, завдяки чому бактеріальна популяція функціонує як багатоклітинний організм. Вони забезпечують дистанційний сигналінг між бактеріями - колонізаторами фітосфери, що дозволяє популяції реагувати на зовнішній сигналінг і встановлювати симбіотичні або антагоністичні відносини з рослиною-господарем.[19,20]

Ці сигнальні молекули містять п'ятичленне гомосеринлактонове кільце й приєднаний до нього через амідний зв'язок варіабельний ацильний бічний ланцюг (рис. 1). Субстратами для синтезу АГЛ є S-аденозилметіонін та продукти метаболізму ліпідів. В ацильному ланцюзі може налічуватись від 3 до 18 атомів вуглецю із замісниками (або без них) у третьому положенні. АГЛ в основному синтезуються грамнегативними бактеріями, проте з'являлись повідомлення про їх виявлення й у грампозитивних бактерій [17,18]

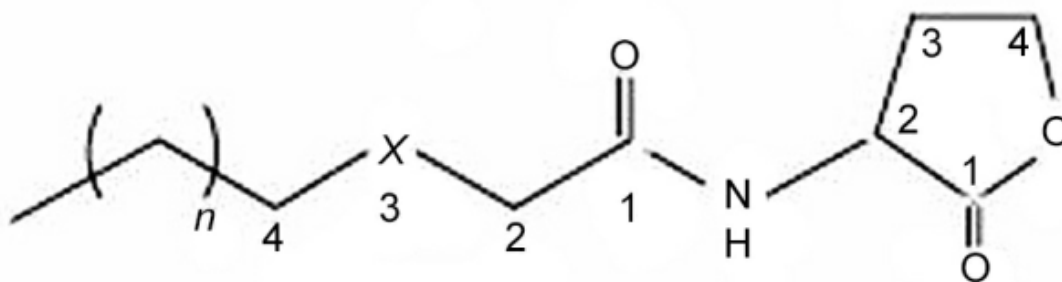


Рис. 1. Загальна структура молекули ацилгомосеринлактону.

X- можливі заміни (H, OH, O) біля третього атома вуглецю в бічному ланцюзі; n — кількість атомів вуглецю в бічному ланцюзі. Молекули АГЛ, синтезовані бактеріями різних видів, відрізняються за довжиною ланцюга і наявністю або відсутністю радикалів у бічному ланцюзі біля теріями власних АГЛ і відокремлення чужорідних [21]. Показано, що бактерії синтезують як коротколанцюгові АГЛ (3—6 атомів вуглецю в ацильній групі), які вільно

II етап

Другий етап синтезу лактону N-гексаноїл-L-гомосерину (С6-HSL) проводився за попереднім методом [23] (Рис 4). 8,7 г триметиламіну додавали до перемішаної суспензії 5 г L-гомосерин-лактон гідрохлориду в 70 мл метиленхлориду при 0°C. Суміш перемішували протягом 30 хв, після чого протягом 10 хв по краплях додавали 4,9 г гексаноїлхлориду. Отриману реакцію продовжували протягом 1 години при 0–5°C, а потім при кімнатній температурі ще 4 години. Суміш двічі промивають 50 мл насиченого гідрокарбонату натрію, двічі 50 мл 1 М гідросульфату калію, а потім 70 мл насиченого хлориду натрію. Розчин С6-HSL в метиленхлориді сушили над сульфатом натрію і розчинник видаляли перегонкою. Білий твердий залишок додатково очищали перекристалізацією в етилацетаті. У цій процедурі вихід С6-HSL становив 60%. Протонний ядерний магнітний резонанс (Отримано спектр ЯМР ¹H, 300 МГц, DMSO-D₆) кінцевого продукту з наступними характеристиками: ¹H ЯМР (DMSO-D₆): δ 0,89 (3H, t, CH₃), 1,31 (4H, m, CH₂), 1,64 (2H, m, CH₂-CH₂-CO), 2,17 (1H, m, 4-α-H), 2,25 (2H, t, CH₂-CO), 2,79 (1H, m, 4-β-H), 4,29 (1H, m, 5-α-H), 4,46 (1H, td, 5-β-H), 4,64 (1H, m, 3-H), 6,5 (1H, d, NH).

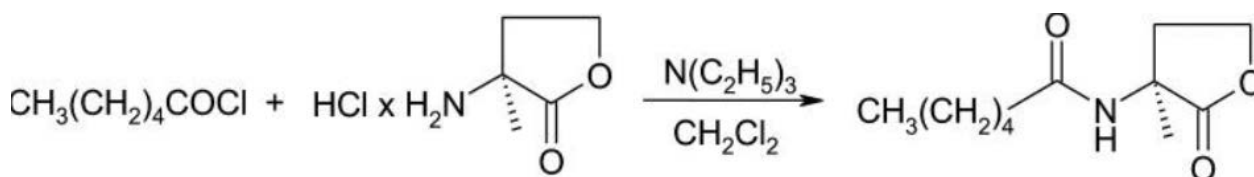


Рис. 4. Синтетичний шлях отримання N-гексаноїл-L-гомосерин-лактону.

1.3 Ацилгомосерин лактони як регулятори врожайності та стресостійкості сільськогосподарських культур.

Ацилгомосеринлактони (АГЛ) - клас молекул медіаторів, що координують активність клітин у популяції грамнегативних бактерій. АГЛ синхронізують індивідуальні клітинні геноми, завдяки чому бактеріальна популяція функціонує як багатоклітинний організм. Вони забезпечують дистанційний сигналінг між бактеріями - колонізаторами фітосфери, що дозволяє популяції

реагувати на зовнішній сигналінг і встановлювати симбіотичні або антагоністичні відносини з рослиною-господарем.[24]

Ауторецепція кількісних параметрів бактеріальної популяції називається quorum sensing (QS).[25] QS-системи утворюють сигнальні молекули аутоіндуктори, що легко проникають з клітин у навколишнє середовище і назад у клітину. Системам QS належить ключова роль регуляції метаболічних і фізіологічних процесів, які у бактеріальній клітині. Бактеріальний сигналінг сприймається еукаріотами, які утворюють симбіоз із мікробними спільнотами. Зростання та розвиток рослини, асиміляція поживних речовин, стресостійкість багато в чому визначаються характером такої взаємодії. Управляти бактеріальним сигналінгом рослині дозволяє система quorum quenching (QQ), механізм дії якої полягає у придушенні рослинними метаболітами синтезу АГЛ, конкуренції з АГЛ за зв'язування з рецепторними білками, репресії QS-контрольованих генів.[26]

Механізми визначення бактеріального кворуму та різні стратегії гасіння кворуму.

Розпізнавання кворуму складається з виробництва та сприйняття бактеріями сигнальних молекул. Сприйняття цих молекул може бути позаклітинним, за допомогою мембранних сенсорів, які індукують каскад фосфорилування, або внутрішньоклітинним за допомогою регуляторів транскрипції. В обох випадках визначення кворуму викликає активацію певних генів, що сприяють груповій поведінці бактерій.[27] Система quorum quenching може діяти на позаклітинному рівні шляхом деградації або секвестрації сигнальних молекул або внутрішньоклітинно за допомогою інгібіторів чутливості кворуму (QSI)(Рис. 5).

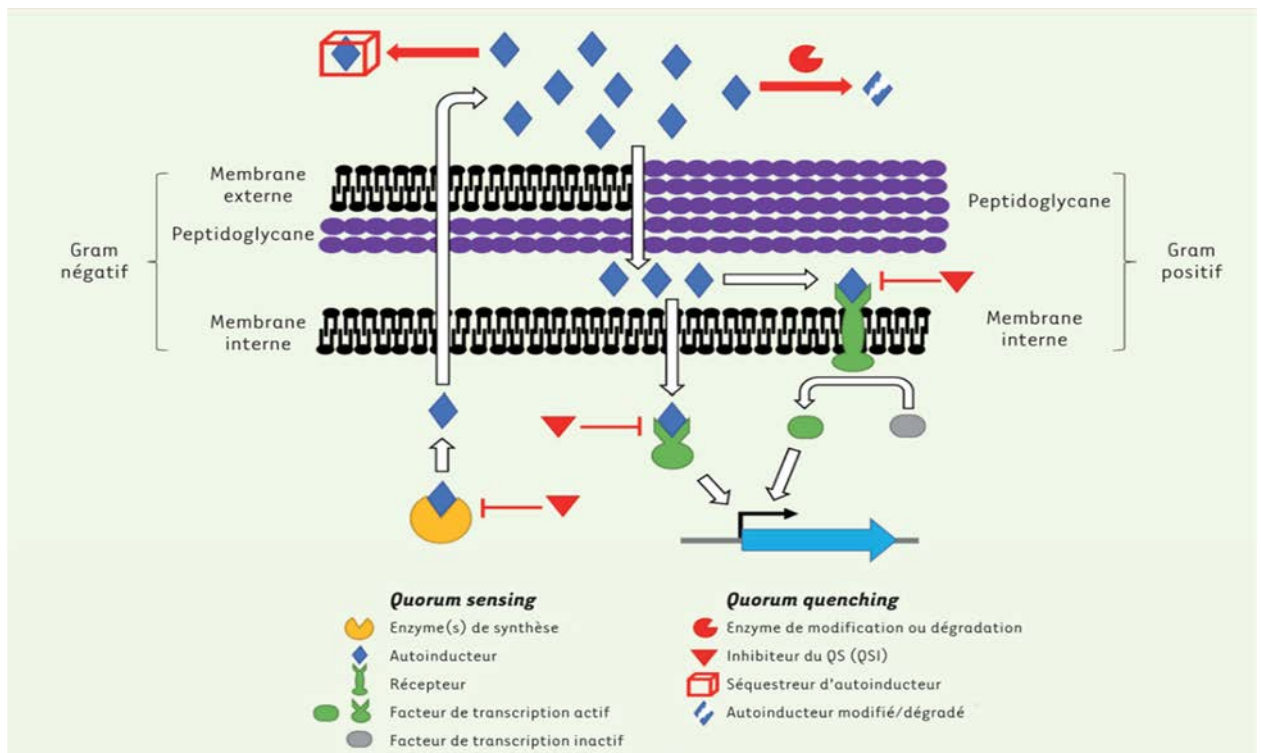


Рис. 5. Механізми визначення бактеріального кворуму та різні стратегії гасіння кворуму.

Проте нині молекулярні механізми, з допомогою яких рослини реагують на бактеріальний сигналінг, остаточно не з'ясовані. Частина метаболітів АГЛ-сигналінгу охарактеризована, проте їхня роль у хімічній взаємодії партнерів у більшості випадків потребує подальшого вивчення. Показано, що явище QS та його учасники причетні до регуляції взаємодій між про- та еукаріотами, у тому числі до формування біоплівок, синтезу фітогормонів, трансферу плазмід, продукції факторів вірулентності, біolumінесценції, споруляції, утворення бульб. Відмінності у будові молекул забезпечують розпізнавання бактеріями власних АГЛ та відділення чужорідних. Перенесення АГЛ від бактерії до рослини-господаря здійснюється за допомогою мембранних везикул. В останні роки активно вивчаються генетика, геноміка, біохімія та сигнальна різноманітність молекул QS. Регулювання функцій ризосфери — найдинамічнішого сайту взаємодії рослини та асоційованої з ним мікрофлори за участю АГЛ набуває особливого значення при розробці нових біотехнологічних підходів, спрямованих на підвищення врожайності та

стресостійкості аграрних культур. Одна з ефективних технологій підвищення стійкості до біотичних та абіотичних стресів – передпосівна обробка (праймування) насіння. Встановлено прямі (спрямовані на рослини) та непрямі (через ризосферну мікрофлору) ефекти АГЛ-праймування. Праймування АГЛ індукує посилення росту рослин, підвищення вмісту фотосинтетичних пігментів, викликає зміни в балансі ендогенних фітогормонів в органах і тканинах, впливає на формування механізмів захисту АГЛ, що відповідають вимогам інтенсивного органічного землеробства, позиціонуються як перспективні екологічні фітостимулятори продукції.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Синтез N-гексаноїл-L-гомосерин лактону

У даному дослідженні для підвищення продуктивності, стійкості та врожайності озимої пшениці був використаний метод обробки насіння та вегетативної маси рослин розчином хімічно синтезованої молекули N-гексаноїл-L-гомосерин лактону у концентрації 100 нг речовини у 1 мл води.[28,29]

Хімічно синтезований N-гексаноїл-L-гомосерин лактон є абсолютним аналогом молекули бактеріального походження. Синтез цієї молекули відбувався в два етапи:

I етап: Синтез L-гомосеринлактонгідрохлориду.

Вихід склав 65%.

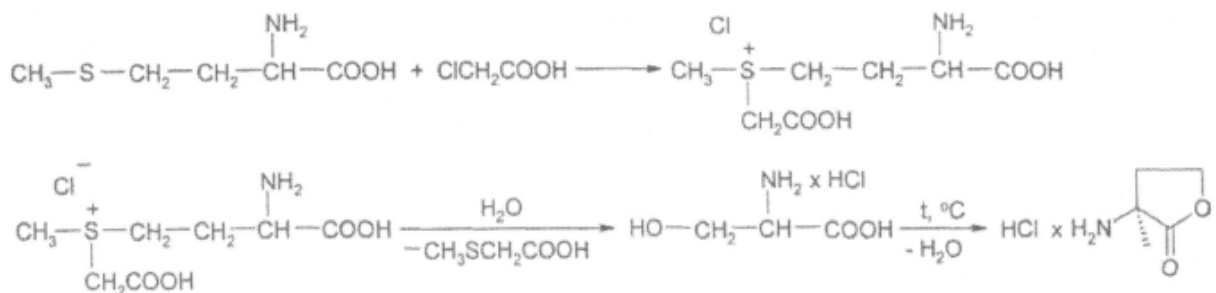


Рис. 1. Схема синтезу L-гомосеринлактонгідрохлориду.

II етап: Синтез N-гексаноїл-L-гомосерин лактону.

Молекулу було отримано через взаємодію базисної речовини L-гомосеринлактонгідрохлориду з гексаноїлхлоридом. Продукт очищували шляхом перекристалізації із етилацетату. Вихід склав 75%.

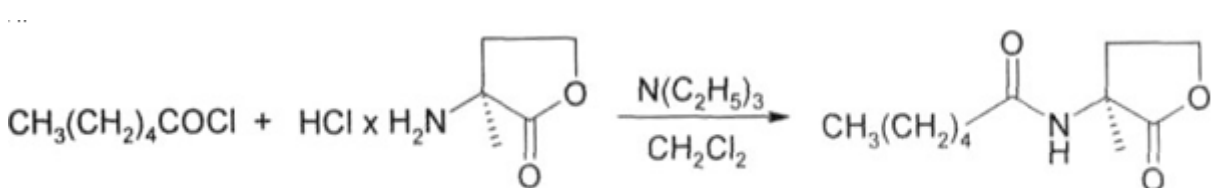


Рис. 2. Схема синтезу N-гексаноїл-L-гомосерин лактону

2.2 Методика застосування

2.2.1 Приклади застосування методу на озимій пшениці сорту Спельти

Приклад 1

Насіння сорту Подалянки замочували у розчині N-гексаноїл-L-гомосерин лактону, що містив 100 нг речовини у 1 мл води протягом трьох годин. На 1,5 кг насіння використовували 3,5 літрів розчину. Після цього насіння висушували та використовували для посіву протягом місяця.

Насіння було посіяне у другій половині вересня 2016 року на полі в Київській області. Протягом вегетативного циклу було виміряно рівні фотосинтетичних пігментів, які суттєво підвищилися за умов обробки запропонованим способом (Таб.2.3.4, Таб. 2.3.5, Таб 2.3.6). Рівень врожайності за умов обробки насіння цього сорту зріс на 62 % з 32 до 54 ц/га (Таб. 2.3.17).

Приклад 2.

Насіння сорту Подолянки замочували у розчині N-гексаноїл-L-гомосерин лактону, що містив 100 нг речовини у 1 мл води протягом трьох годин. На 1,5 кг насіння використовували 3,5 літрів розчину. Після цього насіння висушували та використовували для посіву протягом місяця.

Насіння було посіяне у другій половині вересня 2016 року на полі в Київській області. Протягом вегетативного циклу було виміряно рівні фотосинтетичних пігментів, які суттєво підвищилися за умов обробки запропонованим способом (Таб.2.3.7, Таб. 2.3.8, Таб 2.3.9). Рівень врожайності за умов обробки насіння цього сорту зріс на 51 % з 38 до 58 ц/га (табл. 2.3.17).

Приклад 3.

Насіння сорту Спельти замочували у розчині N-гексаноїл-L-гомосерин лактону, що містив 100 нг речовини у 1 мл води протягом трьох годин. На 1,5 кг насіння використовували 3,5 літрів розчину. Після цього насіння

висушували та використовували для посіву протягом місяця.

Насіння було посіяне у другій половині вересня 2016 року на полі в Київській області. Протягом вегетативного циклу було виміряно рівні фотосинтетичних пігментів, які суттєво підвищилися за умов обробки запропонованим способом (табл. 2.3.10). Рівень врожайності за умов обробки насіння цього сорту зріс на 11 % з 53 до 59 ц/га (2.3.17).

Приклад 4

Рослини сорту Спельти, що було засіяно у другій половині вересня 2016 року на полі в Київській області. Рослини пшениці було оброблено водним розчином N-гексаноїл-L-гомосерин лактону на стадії виходу у трубку (травень) у кількості 8 літрів розчину на 10 м посіву. Така обробка розчином вплинула на вміст фотосинтетичних пігментів. Зокрема, рівні пігментів підвищилися відносно контролю, але майже відповідали рівням пігментів у рослин, що було оброблено винаходом на стадії насіння перед посівом (Таб. 2.3.11). Рівень врожайності рослин за умов фоліарної обробки рослин

2.3 Результати використання методу

При використанні запропонованого методу праймування озимої пшениці ми можемо побачити:

2.3.1. Підвищення якості проростання насіння, суттєве покращення видно вже при першому тесті на 24 годині (Таб 2.3.1), відсоткове співвідношення становить від 14 до 19%. Також помітне підвищення розмірів на 48 годині зростання проростків та довжини корінців і пагонів (Таб 2. 3.2).

Таблиця 2.3.1

Сорт пшениці	Контроль, n=150	Обробка запропонованим способом, n=150	% від контролю
Подеянка	0,826667±0,013686	0,946667±0,014198	+14,5
Спельта	0,82±0,014475	0,97±0,009512	+18,3
За умов інкрустації насіння			
Подоянка	0,81±0,013093	0,966667±0,007968	+19,3
Спельта	0,843333±0,011819	0,97±0,009512	+15

*± стандартна похибка, SE

Таб.2.3.1. Контроль проростання насіння озимої пшениці після обробки N-гексанол-L-гомосерин лактоном, 24 години

Таблиця 2.3.2

Сорт пшениці	Варіант, n=60	Довжина корінця, мм	Довжина пагона, мм	Загальна довжина, мм
Подоянка	Контроль	8,417±0,35922	2,37633±0,17137	10,79333±0,4956
	Обробка запропонованим способом	8,6195±0,54806	2,6185±0,17971	11,238±0,68671
Спельта	Контроль	5,47183±0,46862	1,75383±0,19765	7,22567±0,63482
	Обробка запропонованим способом	10,7075±0,63235	3,23667±0,22174	13,94417±0,80193

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2.2. Морфометричні характеристики проростків озимої пшениці після обробки N-гексаноїл-L-гомосерин лактоном, 48 годин

2.3.2. Підвищення маси проростків на 2 місяці.

Подальша інкрустація препарату AREALBS-05 дуже вплинула на масу двомісячних паростків в умовах відкритого ґрунту, відсоткове співвідношення покращення від контрольних рослин становить 17-32%(Таб 2.3.3).

Таблиця 2.3.3

Сорт пшениці	Контроль, n=3	Обробка запропонованим способом, n=3	% від контролю
Подолька	0,23167±0,00338	0,27233±0,00176	+17,5
Спельта	0,23433±0,00233	0,31033±3,33333E-4	+32,4

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2. 3.3. Суха маса двомісячних рослин озимої пшениці за умов відкритого ґрунту

2.3.3. Підвищення вмісту фотосинтетичних пігментів та хлорофільного індексу у рослин.

Один із головних показників якості, що свідчать про підвищення стійкості озимої пшениці є підвищення рівня фотосинтетичних пігментів у рослин. Під час даного контролю було помітне зростання показників Хлорофілу А, Хлорофілу В та Каротиноїдів (Таб.2. 3.4, Таб. 2. 3.5, Таб 2. 3.6).

Таблиця 2. 3.4

Фаза розвитку	Хлорофіл А, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю
Вихід у трубку	1,52±0,08602	1,912±0,02154	+25,7
Цвітіння	1.808±0,0086	2,614±0,00927	+44,5
Молочна стиглість	1.57±0,0114	2,436±0,016	+55,1
Молочно-воскова стиглість	1,102±0,00927	1,434±0,00927	+30,1

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2. 3.4. Вплив використання методу на вміст Хлорофілу А протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Спельти

Таблиця 2. 3.5

Фаза розвитку	Хлорофіл В, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю
Вихід у трубку	0,552±0,03338	0,624±0,01778	+13
Цвітіння	0,666±0,0103	0,942±0,01562	+41,4
Молочна стиглість	0,564±0,0172	0,832±0,01281	+47,5
Молочно-воскова стиглість	0,308±0,00374	0,412±0,00583	+33,7

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2. 3.5. Вплив використання методу на вміст Хлорофілу В протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Спельти

Таблиця 2. 3.6

Фаза розвитку	Каротиноїди, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю
Вихід у трубку	0,444±0,02379	0,554±0,0172	+24,7
Цвітіння	0,546±0,0103	0,766±0,00812	+40,3
Молочна стиглість	0,452±0,0102	0,676±0,00927	+49,5
Молочно-воскова стиглість	0,454±0,00927	0,578±0,0086	+27,3

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2. 3.6. Вплив використання методу на вміст Каротиноїдів протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Спельти

Таблиця 2. 3.7

Фаза розвитку	Хлорофіл А, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю
Вихід у трубку	1,804±0,00927	2,106±0,00678	+16,7
Цвітіння	2,022±0,0102	2,274±0,00927	+12,4
Молочна стиглість	1,99±0,01049	2,128±0,02154	+6,9
Молочно-воскова стиглість	0,97±0,01095	1,012±0,0102	+43

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2. 3.7. Вплив використання методу на вміст Хлорофілу А протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Подолянки

Таблиця 2. 3.8

Фаза розвитку	Хлорофіл В, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю
Вихід у трубку	0,614±0,1122	0,768±0,00663	+25
Цвітіння	0,656±0,004	0,768±0,00374	+17
Молочна стиглість	0,65±0,01517	0,718±0,01158	+10,4
Молочно-воскова стиглість	0,3±0,00707	0,33±0,01049	+10

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2. 3.8. Вплив використання методу на вміст Хлорофілу В протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Подолянки

Таблиця 2. 3.9

Фаза розвитку	Каротиноїди, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю
Вихід у трубку	0,576±0,01364	0,614±0,00748	+6,6
Цвітіння	0,576±0,0051	0,686±0,0103	+19
Молочна стиглість	0,588±0,01158	0,65±0,01378	+10,5

Молочно-воскова стиглість	0,516±0,00927	0,46±0,01414	-10,8
---------------------------	---------------	--------------	-------

*± стандартна похибка, SE

Таб. 2. 3.9. Вплив використання методу на вміст Каротиноїдів протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Подолянки

На кращу продуктивність фотосинтезу вплинуло підвищення вмісту пігментів у стадіях виходу у трубку та цвітіння. Стабілізація цих пігментів протягом стадій молочної та молочно-волоскової стиглості посприяла подовженню фотосинтетичної активності.

Щоби оцінити стан фотосинтетичного апарата рослин визначали ряд пігментних індексів. Хлорофіл a+b був найбільш показовим індексом сумарного вмісту, суть полягає в тому, що чим більший цей показник, тим більш сприятливими для продуктивності рослини є пігментний склад (Таб 2.10)

Таблиця 2. 3.10

Варіант	a/b	a+b	a+b/k	a/b	a+b	a+b/k	a/b	a+b	a+b/k	a/b	a+b	a+b/k
	Вихід в трубку			Цвітіння			Молочна стиглість			Молочно-воскова стиглість		
Спельта												
контроль	2,59	2,08	4,62	2,74	2,47	4,49	2,81	2,13	4,84	3,53	1,41	3,19
Обробка запропонованим способом	3,02	2,53	4,60	2,77	3,54	4,60	2,93	3,26	4,79	3,52	1,84	3,16
Подолянка												
контроль	2,90	2,42	4,17	3,06	2,68	4,62	3,11	2,63	4,46 1	3,2	1,28	2,56
Обробка запропонованим способом	2,72	2,87	4,70	2,95	3,04	4,41	3,00	2,84	4,37	3,16	1,33	2,89

Таб. 2. 3.10. Співвідношення основних класів фотосинтетичних пігментів в усередненій пробі листків головного пагона в різні фази онтогенезу після праймування

Задля розрахунців хлорофільного індексу були взяті за увагу також розмір асиміляційної поверхні, тривалість та ефективність її функціонування, а також кількість продуктивного стеблостою. Дані показники мають чималий вплив на продуктивність пшениці.

Праймування пшениці може бути використаним також на стадії виходу в трубку, це так звана фоліарна обробка. Дослідження показали, що після фоліарної обробки вміст фотосинтетичних пігментів не відрізнявся від вмісту пігментів за умов обробки на стадії насіння, у фазах цвітіння та молочної спілості. Однак, було засвідчено, що вміст хлорофілів підвищувався майже двічі на стадії молочно-волоскової стиглості. (Таб 2.11,12,13)

Таблиця 2.11

Фаза розвитку	Хлорофіл А, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	
		Насіння	Фоліарне
Цвітіння	1,808±0,0086	2,614±0,00927	2,714±0,01122
Молочна стиглість	1,57±0,0114	2,436±0,016	2,214±0,01122
Молочно-воскова стиглість	1,102±0,01655	1,434±0,00927	1,836±0,01435

Таб. 2.11. Вплив використання фоліарної обробки на вміст Хлорофілу А протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Спельти

Таблиця 2.12

Фаза розвитку	Хлорофіл В, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	
		Насіння	Фоліарне
Цвітіння	0,666±0,0103	0,942± 0,01562	0,912±0,01068

Молочна стиглість	0,564±0,0172	0,832± 0,01281	0,694±0,00748
Молочно-воскова стиглість	0,308±0,00374	0,412±0,00583	0,61±0,0 0894

Таб. 2.12. Вплив використання фолірної обробки на вміст Хлорофілу В протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Спельти

Таблиця 2.13

Фаза розвитку	Каротиноїди, n=5		
	Контроль	Обробка запропонованим способом	
		Насіння	Фоліарне
Цвітіння	0,546± 0,0103	0,766±0,00812	0,62±0,01049
Молочна стиглість	0,452± 0,0102	0,676±0,00927	0,494±0,0051
Молочно-воскова стиглість	0,454±	0,578±0,0086	0,45±0,01342

Таб. 2.13. Вплив використання фолірної обробки на вміст Каротиноїдів протягом продуктивного циклу рослин озимої пшениці сорту Спельти

2.3.4. Епігенетичний ефект продуктивності врожайності рослин озимої пшениці

Використання N-гексаноїл-L-гомосерин лактону при обробці насіння показав позитивну зміну структури врожайності та епігенетичний ефект покращення продуктивності. Такий показник як епігенетичний ефект показав суттєві покращення врожайності пшениці, що були отримання від батьків, або F1 покоління (Таб. 2.14, 2.15).

Таблиця 2.14

Спельта	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю	F1	% від контролю
Висота, см	79,35±1,5 5	80,85±2,24	-	79,51±2,5 9	-
Продуктивна кущистість	2,00±0,88	4,7±1,38	+135	3,68±0,98	+84
Висота колосу	12,96±1,1 3	13,94±1,08	+7	13,47±1,0 1	+4
Кількість колосків	15,25±2,8 7	20,04±2,97	+31	17±2,99	+11
Кількість зерна у колоску	38,12±4,3 6	46,48±5,91	+22	40,93±2,9 4	+7
Вага зерна у колоску	1,52±0,33	1,84±0,44	+21	1,62±0,33	+6

Таб. 2.14. Результати врожайності рослин озимої пшениці сорту Спельти запропонованим методом обробки за 2017 рік

Таблиця 2.15

Подольнянка	Контроль	Обробка запропонованим способом	% від контролю	F1	% від контролю
Висота, см	82,17±1,7 3	83,38±2,59	-	80,78±1,8	-
Продуктивна кущистість	2,10±0,72	4,39±1,26	+109	3,06±0,94	+45
Висота колосу	12,21±1,2 4	13,05±1,15	+7	12,32±1,4	-
Кількість колосків	18,08±0,7 4	18,76±1,86	+4	18,23±1,5 3	-
Кількість зерна у колоску	36,38±4,0 3	40,19±4,91	+10	40,27±4,5 4	+10
Вага зерна у колоску	1,67±0,36	2,20±0,56	+34	1,71±0,38	-

Таб. 2.15. Результати врожайності рослин озимої пшениці сорту Подольнянки запропонованим методом обробки за 2017 рік

Головною суттю використання запропонованого методу є підвищення врожайності пшениці за різних несприятливих погодних умов. Як було вище зазначено, проводилися польові дослідження в умовах відкритого ґрунту та винахід показав підвищення врожайності до 41-94% у дворічних випробовуваннях (Таб. 2.16) та 11-62% у однорічному випробовуванні (Таб. 2.17)

Таблиця 2.16

Сорт пшениці	Контроль кг/м ²	Обробка запропонованим способом		F1	
		кг/м ²	%від контролю	кг/м ²	%від контролю
Спельта	0,380	0,616	+62	-	-
Спельта	0,266	0,402	+51	0,387	+45
Подольанка	0,419	0,593	+41	-	-
Подольанка	0,250	0,485	+94	0,342	+36

Таб. 2.16. Врожайна продуктивність рослин озимої пшениці у 2016 та 2017 роках

Таблиця 2.3.17

Сорт пшениці	Контроль, ц/га	Обробка запропонованим способом	
		кг/м ²	%від контролю
Спельта	32,325±0,90323	52,475±0,69806	+62
Подольанка	38,85±0,40517	58,6625±0,21348	+51

Таб. 2.3.17. Врожайна продуктивність рослин озимої пшениці у 2017 році

Якщо говорити щодо використання праймування пшениці N-гексаноїл-L-гомосерин лактоном як фоліарної обробки, то такий спосіб дає ефект підвищення врожайності вищий на 11%, ніж за умови обробки насіння (Таб. 2.18).

Таблиця 2.18

Сорт пшени ці	Контроль, ц/га	Обробка запропонова ним способом насіння	% від контрол ю	Фоліарна обробка запропонова ним способом	% від контролю/обро бки насіння
Спель та	32,325±0,90 323	52,475±0,698 06	+62	58,225±0,396 6	+80/11

Таб. 2.18. Результати врожайної продуктивності рослин озимої пшениці за умов фоліарної обробки у 2017 році

РОЗДІЛ 3. ВИСНОВКИ

Дана дипломна робота стосується аграрних біотехнологій, а саме до способу підвищення стійкості та врожайності озимої пшениці і може бути використаний для вирощування озимої пшениці та інших злаків з метою підвищення продуктивності, стресостійкості та екологізації аграрних біотехнологій.

Було доведено що:

1. Бактеріальні АГЛ, такі як N-гексаноїл-L-гомосерин лактон, впливають на ріст рослин і стійкість до патогенів у лабораторних експериментах.
2. Ця робота надає докази, які свідчать про те, що N-гексаноїл-L-гомосерин лактон може бути життєздатним фітостимулятором при застосуванні як ґрунтовка для насіння озимої пшениці. Значні покращення, які спостерігаються у зростанні пшениці, продуктивності та структурі врожайності, пояснюються більш здоровими та міцними рослинами внаслідок прямого або непрямого впливу N-гексаноїл-L-гомосерин лактон на проростання насіння, ріст та дозрівання рослин.
3. Розробка нових фітостимуляторів на основі бактеріальних АГЛ як частини сучасного захисту рослин у поєднанні з новими бактерицидами, фунгіцидами, сортами сільськогосподарських культур, агротехнікою тощо могла б забезпечити більш досконалий засіб боротьби з патогенами рослин та збільшення стабільний урожай у майбутньому.

Таким чином, запропонований спосіб є екологічно безпечним, не містить ксенобіотиків та хімічно стабільних компонентів, а продукти деградації якого не є токсичними. У винаході концентрація біологічно активної сполуки є мінімальною та набагато нижчою за концентрацію, що використовується (вивільняються) бактеріями. Таким чином, винахід не може чинити

безпосереднього негативного впливу на екосистему та здоров'я людини та тварин.

Список використаної літератури

1. Brecker-Reshef I, Vermore E, Lindeman M, Justice C. Узагальнена модель на основі регресії для прогнозування врожайності озимої пшениці в Канзасі та Україні з використанням даних MODIS . *Середовище дистанційного зондування* . 2010; 114 : 1312–1323. 10.1016/j.rse.2010.01.010
2. Коган Ф, Кусуль Н, Адаменко Т, Скакун С, Кравченко О, Кривобок О та ін. Прогноз урожайності озимої пшениці в Україні на основі спостережень Землі, метеорологічних даних та біофізичних моделей . *Inter J Appl Earth Obser Geoinformat* . 2013; 23 : 192–203. 10.1016/j.jag.2013.01.002
3. Tadesse W, Solh M, Braun HJ, Oweis T, Baum M. Підходи та стратегії для сталого виробництва пшениці: інструменти та рекомендації ; ICARDA: Бейрут, Ліван: 2016; ISBN 92-9127-490-9.
4. Олексин А., Ботвинко И., Цевкелова У. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // *Микробиология*. — 2000. — 69, № 3. — С. 309—327.
5. Kievit T., Iglewsky B. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships // *Infect. Immun.* — 2000. — 68, N 9. — P. 4839—4849
6. Крестецька С.Л., Нестеренко А.М. Аутоіндукція та сигнальна трансдукція: комунікаторні системи в мікробних популяціях // *Annals of Mechnicov Institute*. — 2007. — № 1. — С. 4—9.
7. Bassler B. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria // *Cell*. — 2002. — 109, N 4. — P. 421—424.
8. Whitehead N., Barnard A., Slater H. Quorum sensing in Gram-negative bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2001. — 25. — P. 365—404.
9. Manos J. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung // *J. Med. Microbiol.* — 2008. — 57. — P. 1454—1465
10. Van Elsas J.D., Tumer S., Bailey M.J. Horizontal gene transfer in the phytosphere // *New Phytol.* — 2003. — 157. — P. 525—537
11. Van Peer P., Punte H.L.M., De Weger L.A., Schippers B. Characterization of root surface and endorhizosphere *Pseudomonas* in relation to their colonization of roots // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1990. — 56. — P. 2462—2470.
12. Normander B., Prosser J.L. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — 66. — P. 4372—4377.
13. Fukua W., Winans S., Greenberg E. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators // *J. Bacteriol.* — 1994. — 176. — P. 269—275.

- 14.Revenchon S., Bouillant M.L., Salmond G., Nasser W. Integration of the quorum sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemii* // *Mol. Microbiol.* — 1998. — 29, N. — P. 1407—1418.
- 15.Salmond G.P.C., Bycroft B.W., Stewart C.S.A.B., Williams P. The bacterial «enigma»: cracking the code of cell-cell communication // *Ibid.* — 1995. — 16, N 4. — P. 615—624.
- 16.Mark J., Mandel Michael S., Wollenberg Eric V. et al. A single regulatory gene is sufficient to alter bacterial host range // *Nature.* — 2003. — 458. — P. 215—218.
- 17.Natelson S., Natelson E.A. Preparation of D-, DL- and L-homoserine lactone from methionine // *Microchem. J.* — 1989. — 40. — P. 226—232
- 18.Parsek M., Val D., Hanzelka B. Acyl homoserine lactone quorum-sensing signal generation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — 96. — P. 4360—4365.
- 19.Iida A., Ohnishi Y., Horinouchi S. Control of acetic acid fermentation by quorum sensing via N-acylhomoserine lactones in *Gluconacetobacter intermedius* // *J. Bacteriol.* — 2008. — 190, N 7. — P. 2546—2555.
- 20.Iida A., Ohnishi Y., Horinouchi S. Identification and characterization of target genes of the GinI/GinR quorum-sensing system in *Gluconacetobacter intermedius* // *Microbiology.* — 2009. — 155. — P. 3021—3032.
- 21.McLean R.J., Pierson L.S., Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists // *J. Microbiol. Methods.* — 2004. — 58. — P. 351—360.
- 22.Licciardello G, Bertani I, Steindler L, Bella P, Venturi V, Catara V. *Pseudomonas corrugata* містить консервативну систему визначення кворуму лактону N-ацил гомосерину; його роль у патогенності томатів та реакції гіперчутливості до тютюну . *FEMS Microbiol Ecol* . 2007; 61 : 222–234. 10.1111/j.1574-6941.2007.00338.x
- 23.Natelson S, Natelson EA. Отримання лактону D-, DL- і L-гомосерину з метіоніну . *Мікрохімічний J* . 1989; 40 : 226–232. 10.1016/0026-265X(89)90074-X
- 24.Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 165-199 (doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165).
- 25.Abisado R.G., Benomar S., Klaus J.R., Dandekar A.A., Chandler J.R. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *mBio*, 2018, 9(3): e02331-17 (doi: 10.1128/mBio.02331-17).
- 26.Chagas F.O., Pessotti R.C., Caraballo-Rodríguez A.M., Pupo M.T. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(5): 1652-1704 (doi: 10.1039/C7CS00343A).
- 27.Sharma A., Kumar V., Shahzad B., Tanveer M., Sidhu G.P.S., Handa N., Kohli S.K., Yadav P., Bali A.S., Parihar R.D., Dar O.I., Singh K., Jasrotia S., Bakshi P., Ramakrishnan M., Kumar S., Bhardwaj R., Thukral A.K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 2019, 1: 1446 (doi: 10.1007/s42452-019-1485-1).

28. [Електронне джерело]
<http://www.elcomltd.com.ua/component/content/article/38-2014-02-08-11-06-25/2535-BAKTER%D0%86ALNE-DOBRIVO-AZOLEK>
29. Chhabra S.R., Harty C, Hooi D.S.W., Daykin M., Williams P., Telford G., Pritchard D. L, Вусcroft B.W. Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J. Med. Chem.*, 2003, 46: 97-104.
30. Кириченко О.В. Бактеріальні композиції - ефективний елемент біотехнології вирощування пшениці. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*, 2013, 2(29): 83-92.