

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

УДК 579.64; 579.262; 579.264; 632.3

ПАСТОЩУК АЛІНА ЮРІЇВНА

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЕНДОФІТНІ МІКРООРГАНІЗМИ ЗЕРНА ПШЕНИЦІ З
АНТАГОНІСТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО
*PSEUDOMONAS SYRINGAE***

Спеціальність – 091 «Біологія»

Галузь знань – 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ А.Ю. Пастощук

Науковий керівник: Сківка Лариса Михайлівна, доктор біологічних наук,

професор.

Аліна
Юріївна

Ідентифікаційний
код
3432903281



Київ–2022

Анотація

Пастошук А. Ю. Ендофітні мікроорганізми зерна пшениці з антагоністичною активністю по відношенню до *Pseudomonas syringae*. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091-Біологія (09 – Біологія). ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, МОН України, Київ, 2022.

Ендофіти - це симбіотичні мікроорганізми (включаючи бактерії, гриби, віруси тощо), які безсимптомно живуть у тканинах різних рослинних органів в тому числі і зерні. Ендофітні мікроорганізми представляють значний інтерес з точки зору їх використання в агробіотехнології для сталого сільського господарства, оскільки володіють здатністю активувати захисні реакції рослин проти збудників інфекційних захворювань та можуть чинити прямий антагоністичний вплив на фітопатогени. Препарати на основі ендофітних мікроорганізмів можуть застосовуватися для покращення властивостей ґрунту та підвищення врожайності сільськогосподарських культур, особливо основних зернових, таких як пшениця, рис. Урожайність пшениці – основної зернової культури, яка має виключне значення для продовольчої безпеки України – значно знижується через інфекційні хвороби.

Провідне місце у структурі патогенного комплексу інфекційних захворювань пшениці посідають фітопатогенні гриби. На другому місці – вірусні і бактеріальні захворювання. Основним збудником бактеріозів пшениці є фітопатогенні псевдомонади. Основним джерелом бактеріальної інфекції є уражене зерно, механізми стійкості якого до фітопатогенних бактерій, у тому числі й детерміновані симбіотичними мікроорганізмами, мають важливе значення для боротьби з бактеріозами. Спрямованість на біологізацію агропромислового виробництва потребує дослідження екології симбіотичних мікроорганізмів пшениці з метою розробки засобів біоконтролю фітопатогенів.

З огляду на вище зазначене, робота присвячена пошуку та дослідженню мікроорганізмів у складі ендofітних угруповань зерна пшениці з антагоністичною активністю щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Перший етап роботи полягав у порівняльному аналізі чутливості сортів пшениці вітчизняної і зарубіжної селекції, рекомендованих для вирощування на території України, до фітопатогенних псевдомонад та їхніх ліпополісахаридів (ЛПС). Для дослідження використовували два патовари *P. syringae*: адаптований до пшениці патовар *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, який є основним збудником базального бактеріозу зернових культур, а також патовар *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. Останній є патоваром фітопатогенних псевдомонад з широким спектром рослин-хазяїв, у т.ч. пшениці, що дозволяє розглядати його як неадаптований патоген. Включення у дослідження адаптованого (host) та неадаптованого (non-host) патоварів дало можливість порівняти механізми резистентності зерен пшениці у випадку різних біологічних властивостей інфекційного чинника, оскільки резистентність до non-host наразі розглядається як нова мішень для селекції стійких сортів сільськогосподарських культур. Включення у дослідження бактеріальних ЛПС обумовлювалося їх виключним значенням для вірулентності патогенів, важливою роллю у патологічному процесі і формуванні захисних імунних реакцій ураженої рослини.

Було встановлено, що стійкість зерна пшениці до живих клітин та ЛПС адаптованого та неадаптованого патоварів *P. syringae* не є абсолютно ідентичною і за деякими характеристиками відрізняється, що може вказувати на відмінності у механізмах резистентності.

Резистентність рослини до патогенних мікроорганізмів реалізується на трьох рівнях: фізичні бар'єри, захисні реакції, індуковані молекулярними патернами патогенів, та імунні реакції, ініційовані ефекторними білками патогенів. Каскад захисних реакцій після розпізнавання молекулярних патернів патогенів включає генерацію активних форм кисню (АФК), які виконують сигнальну та бактерицидну функції. Неконтрольована продукція АФК є причиною пошкодження рослинних тканин. Контроль генерації АФК здійснюється антиоксидантною системою. Від

збалансованості оксидантно-антиоксидантної системи значною мірою залежить маніфестація патологічного процесу. Наступним завданням роботи стало вивчення оксидативних процесів та функціонування антиоксидантних систем у проростках пшениці за умов обробки зерна бактеріальними клітинами та їх ЛПС.

Статистично вірогідне накопичення активних форм кисню спостерігали у проростках сорту Фаворитка з низькою стійкістю до фітопатогену. Крім того, обробка зернівок цього сорту адаптованим патоваром спричиняла різку активацію ферментів антиоксидантного захисту, експозиція неадаптованим патоваром – різке накопичення проліну, чого не спостерігалось у випадку стійких сортів.

Встановлено, що низька стійкість до фітопатогенних псевдомонад асоційована з відсутністю оксидантно-антиоксидантного балансу: зниженим спонтанним рівнем активних форм кисню, зниженою спонтанною активністю супероксиддисмутази та дуже низьким рівнем проліну порівняно зі стійкими сортами. Висловлено припущення про те, що різке накопичення проліну з подальшим його окисненням є механізмом оксидативного стресу у тканинах проростків чутливого сорту.

За результатами перших двох етапів дослідження було обрано три сорти пшениці для подальшого дослідження зернових ендofітних бактеріальних угруповань: високо стійкий сорт (Подольянка), помірно стійкий сорт (Діскус) і сорт з низькою стійкістю (Фаворитка).

Наступним етапом роботи було визначення кількісних та морфолого-культуральних властивостей ендofітів зерна сортів озимої пшениці з різною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад та їхніх ЛПС. Загальна кількість ендofітних бактерій на грам сухого зерна була на порядки вищою у зернівках стійких сортів. Бактеріальні морфотипи були представлені грамнегативними паличками, спороутворюючими бацилами та грампозитивними коками. Показано, що стійкість до *P. syringae* pv. *atrofaciens* була пов'язана з високою загальною кількістю культурабельних ендofітних бактерій з переважанням грамнегативних паличок та/або спороутворюючих бацил, але не грампозитивних коків.

Наступним завданням стало вивчення фізіологічних властивостей ендоефітних бактерій зерна. Ізоляти зернових ендоефітних бактерій володіли різними рістстимулювальними для рослини фізіологічними властивостями: олігонітотрофією, здатністю солубілізувати фосфати і продукувати індоламінооцтову кислоту. Найбільшу частку ізолятів із рістстимулювальними фізіологічними властивостями виявлено у зерновому ендоефіті високо стійкого сорту Подолянка. Ендоефіт низькостійкого сорту Фаворитка містив найменшу частку бактерій із рістстимулювальними властивостями. Деякі ізоляти ендоефітів виявляли одночасно дві або навіть три різні рістстимулювальні властивості. Найбільша частка зернових бактеріальних ізолятів, що проявляли усі три рістстимулювальні властивості, була зареєстрована у сорту пшениці з найвищою стійкістю до фітопатогену.

Таким чином, стійкість до псевдомонад була асоційована з найбільшою часткою зернових ендоефітів, що володіли одночасно кількома рістстимулювальними властивостями. Це свідчить про те, що наявність у складі культурабельної ендоефітної мікробіоти бактерій з множинними рістстимулювальними властивостями може бути одним з механізмів стійкості до фітопатогенних мікроорганізмів.

Ще одним механізмом стійкості до фітопатогенів, який забезпечується ендоефітною мікробіотою, може бути її прямий антагоністичний вплив на шкочочинні мікроорганізми, вивчення якого і стало наступним завданням. Серед усіх виділених ізолятів ендоефітних бактерій було виявлено 5 з антагоністичною активністю щодо *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Слід зазначити, що частка бактерій з антагоністичною активністю у загальній кількості ендоефітів була значно вищою у сортів з високою стійкістю. Із зерна сортів Подолянка і Діскус виділено по два ізоляти-антагоністи. Один виділено із зерна сорту Фаворитка. Найвищу антагоністичну активність зареєстровано у ізоляту, виділеного із сорту Подолянка. Було проведено ідентифікацію ізолятів ендоефітних бактерій з антагоністичною активністю за їх біохімічним профілем на мікробіологічному аналізаторі, а також

методом MALDI-TOF мас-спектрометрії та методом секвенування фрагмента гена 16S рибосомальної РНК.

Два штами-антагоністи (F1 і D2) було ідентифіковано до роду *Bacillus*, філогенетичної групи *Bacillus subtilis*. До цього ж роду але іншої філогенетичної групи було віднесено штаму, *Bacillus pumilus* D5. Штаму P10 ідентифіковано як представник роду *Brevibacillus* з найбільшим ступенем ідентичності з *Brevibacillus brevis*, а штаму P6 – як представник роду *Paenibacillus*. Слід відмітити, що штами ендоефітних бактерій з найвищою антагоністичною активністю володіли також кількома рістстимулювальними властивостями, що робить їх перспективними агентами для розробки агробіотехнологічних препаратів.

Отже, за результатами дисертаційного дослідження було розширено існуючі уявлення щодо різноманітності культурабельних ендоефітних бактерій зерна пшениці. Показано, що існує прямий взаємозв'язок між кількісними та функціональними характеристиками зернових ендоефітних бактерій та стійкістю зернівок до адаптованого (хазяйського) патогену *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*: підвищена резистентність до збудника асоційована з кількістю зернових ендоефітних бактерій $\geq 10^4$ - 10^5 , переважанням морфотипу бацил і грамнегативних паличок, значною часткою у складі ендоефітного мікробного угруповання бактерій з кількома рістстимулювальними властивостями і прямою антагоністичною дією проти збудника. Результати проведених досліджень вказують на те, що пошук перспективних ендоефітів для розробки агробіотехнологічних препаратів для стимуляції росту і захисту пшениці від фітопатогенних псевдомонад слід проводити у рослинному матеріалі стійких сортів. Виділені нами штами-антагоністи є перспективними для розробки таких біопрепаратів.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae*, прикоренева гниль пшениці, фітофтороз, зернові ендоефітні бактерії, ріст-стимулювальні властивості, антагоністичні властивості, агробіотехнологія.

Summary

Pastoshchuk A. Y. Endophytic microorganisms of wheat grain with antagonistic activity against *Pseudomonas syringae*. Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for PhD (Doctor of Philosophy) degree in speciality 091-Biology (09 – Biology). – ESC (Educational and Scientific Center) «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

Endophytes are symbiotic microorganisms (including bacteria, fungi, viruses, etc.) that live asymptotically in various plant tissues, including grains. Endophytic microorganisms are of great interest in terms of their use in agrobiotechnology for sustainable agriculture, since they have the ability to activate the protective reactions of plants against infectious agents and can exert a direct antagonistic effect on phytopathogens. Preparations based on endophytic microorganisms can be used to improve soil properties and increase crop yields, especially basic cereals such as wheat and rice. The yield of wheat - the main grain crop, which is extremely important for food security in Ukraine - is significantly reduced due to infectious diseases.

Phytopathogenic fungi occupy a leading place in the structure of the pathogenic complex of infectious diseases of wheat. Phytopathogenic viruses and bacteria are also important causative agents of wheat infectious diseases. Phytopathogenic pseudomonads are main causative agents of wheat bacterial diseases. The main source of bacterial infection is the affected grain, the mechanisms of resistance to phytopathogenic bacteria, including those determined by symbiotic microorganisms, are important for the fight against bacteriosis. The biological control of crop infections is environmentally friendly agricultural pest control method, is regarded as most promising approach for sustainable agriculture.

Considering the aforementioned facts, the work is devoted to the search and study of microorganisms in the wheat grain-resided endophytic communities with antagonistic activity against *P. syringae*.

The first stage of the work was a comparative analysis of the sensitivity of wheat varieties of domestic and foreign selection, recommended for cultivation in Ukraine, to phytopathogenic pseudomonads and their lipopolysaccharides (LPS). Two *P. syringae* pathovars were used for the study: wheat host pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, which is the main causative agent of basal glume rot of wheat and leaf blight, as well as the *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. The latter is a pathovar of phytopathogenic pseudomonads with a wide range of host plants, including wheat, which allows us to consider it as a non-host pathogen. The inclusion of adapted (host) and non-adapted (non-host) pathogens in the study made it possible to compare the mechanisms of wheat grain resistance in the case of different biological properties of the infectious agents, since non-host resistance is currently considered a new target for breeding resistant varieties. The inclusion in the study of bacterial LPS was due to their exceptional importance for the virulence of pathogens, their important role in the pathological process and the formation of protective immune responses in the affected plant.

Plant resistance to pathogenic microorganisms is realized at three levels: physical barriers, protective reactions induced by molecular patterns of pathogens, and immune reactions initiated by effector proteins of pathogens. The cascade of protective reactions after the recognition of molecular patterns of pathogens includes the generation of reactive oxygen species (ROS), which perform signal and bactericidal functions. Uncontrolled ROS production is the cause of plant tissue damage. ROS generation is controlled by the antioxidant system. The manifestation of the pathological process largely depends on the balance of the oxidative-antioxidant system. The next task of the work was to study the oxidative processes and the functioning of antioxidant systems in wheat seedlings under the conditions of treatment of grains with bacterial cells and their LPS.

Statistically significant ROS accumulation was observed in seedlings of the cultivar Favoritka with low resistance to phytopathogenic. In addition, the treatment of grains of this variety with adapted pathovar caused a sharp activation of antioxidant enzymes, exposure to non-adapted potato - a sharp accumulation of proline, which was not observed in the case of resistant varieties.

Thus, it was found that low resistance to phytopathogenic pseudomonads is associated with a lack of oxidative-antioxidant balance: reduced basal ROS level, reduced basal superoxide dismutase activity and very low levels of proline compared to resistant varieties. It has been suggested that the sharp accumulation of proline with its subsequent oxidation is a mechanism of oxidative stress in the tissues of seedlings of sensitive varieties.

According to the results of the first two stages of the study, three wheat varieties were selected for further study of grain-resided endophytic bacterial communities: high-resistant variety (Podolyanka), moderately resistant variety (Discus) and low-resistance variety (Favoritka).

The next stage of the work was to determine the quantitative, morphological and cultural properties of the culturable endophytic bacteria from winter wheat grain varieties with different sensitivity to phytopathogenic pseudomonads and their LPS. The total count of endophytic bacteria per gram of dry grain was a one or two orders of magnitude higher in the grains of resistant varieties. Bacterial morphotypes were represented by gram-negative rods, spore-forming bacilli and gram-positive cocci. Resistance to *P. syringae* has been shown to be associated with a high total number of culturable endophytic bacteria with a predominance of gram-negative rods and / or spore-forming bacilli, but not gram-positive cocci.

The next task was to study the physiological properties of grain-resided endophytic bacteria. Isolates of grain endophytic bacteria had various plant growth-promoting (PGP) physiological properties: oligonitrotrophy, the ability to solubilize phosphates and produce indolaminoacetic acid. The largest proportion of isolates with PGP properties was found in the grain endophyte of the highly resistant Podolyanka variety. The endophyte of low-resistant variety contained the smallest proportion of bacteria with PGP properties. Some isolates of endophytes showed two or even three different PGP properties simultaneously. The largest fraction of bacterial isolates with multiple PGP properties was registered in the wheat variety with the highest resistance to phytopathogen.

Thus, resistance to pseudomonads was associated with the largest proportion of grain endophytes with multiple PGP properties. This suggests that the presence of bacteria with multiple PGP properties can be one of the mechanisms of resistance to phytopathogenic microorganisms.

Another mechanism of resistance to phytopathogens, which is provided by the endophytic microbiota, may be its direct antagonistic effect on infectious agents, the study of which has become the next task. Totally 5 isolates with antagonistic activity against *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* were obtained. It should be noted that the proportion of bacteria with antagonistic activity was significantly higher in varieties with high resistance to pseudomonads. Two antagonists were isolated from Podolyanka and two - from Discus grains. One isolate with antagonistic activity was obtained from the grain of the Favoritka variety. The highest antagonistic activity was registered in the strain isolated from Podolyanka variety. Isolates of endophytic bacteria with antagonistic activity were identified by their biochemical profile using a microbiological analyzer, as well as by MALDI-TOF mass spectrometry and sequencing of a 16S rRNA.

Two antagonist strains (F1 and D2) were identified to the genus *Bacillus*, a phylogenetic group of *Bacillus subtilis*. A strain, *Bacillus pumilus* D5, was assigned to the same genus but a different phylogenetic group. Strain P10 was identified as a member of the genus *Brevibacillus* with the greatest degree of identity with *Brevibacillus brevis*, and strain P6 as a representative of the genus *Paenibacillus*. It should be noted that the strains of endophytic bacteria with the highest antagonistic activity also had multiple growth-promoting properties, which makes them promising agents for the development of agrobiotechnological preparations.

Thus, the existing ideas about the diversity of culturable endophytic bacteria of wheat grains were expanded as a result of our study. There is a direct relationship between the quantitative and functional characteristics of grain endophytic bacteria and the resistance to the *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*: increased resistance to the pathogen is associated with the number of grain endophytic bacteria $\geq 10^4$ - 10^5 , the predominance of the morphotype of bacilli and gram-negative rods, a significant share in the endophytic microbial group of bacteria with several growth-promoting properties and

direct antagonists. One can suggest that the search for promising endophytes for the development of biocontrol agents with PGP properties should be carried out in plant material of resistant varieties. Isolated grain-resided bacteria with antagonistic activity against...can be considered as promising agents for these preparations.

Key words: *Pseudomonas syringae*, basal glume rot of wheat, leaf blight, grain-resided endophytic bacteria, plant growth promoting activity, antagonistic activity, agrobiotechnology.

Список публікацій здобувача

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Пастошук, А.Ю., Сківка, Л.М., Буценко, Л. М., Патица, В. П. (2018). Вплив збудника базального бактеріозу на проростання зерен та ріст проростків пшениці різних сортів. Мікробіологія і біотехнологія, 2(42): 39. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134449](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134449).

Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, пошук літератури, підготовка статті до друку. 0,65 авторських аркушів).

2. Пастошук А.Ю., Буценко, Л. М., Сківка, Л. М. (2019). Вплив *Pseudomonas syringae* на інтродуковані сорти пшениці. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол., 2 (76): 85-90 <https://doi.org/10.25128/2078-2357.19.2.14>.

(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку. 0,42 авторських аркушів)

3. Пастошук, А., Коваленко, М., Сківка, Л. (2021). Антиоксидантні реакції проростків озимої пшениці за впливу *Pseudomonas syringae* та їхніх ліпополісахридів in vitro. Вісник КНУ ім. Тараса Шевченка, Т. 84(1): 61-66. https://doi.org/10.17721/1728_2748.2021.84.61-66.

(Особистий внесок здобувача – пошук літератури, проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку. 0,40 авторських аркушів).

4. Pastoshchuk, A., Yumyna, Y., Zelena, P., Nudha, V., Yanovska, V., Kovalenko, M., Taran, N., Palyuka, V., Skivka, L. Beneficial traits of grain-resided endophytic communities in wheat with different sensitivity to *Pseudomonas syringae*. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021; 12(3): 498-505. <https://doi.org/10.15421/022168>. Web of Science

(Особистий внесок здобувача – пошук літератури, проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку. 0,39 авторських аркушів).

5. Пастошук, А., Шустик, Д., Зелена, П., Юмина, Ю.М., Сківка, Л., М. Антимікробна активність екзометаболітів *Raenibacillus Polytuxa*, виділених з ендоефітного угруповання зерна озимої пшениці. Наукові доповіді НУБіП України. 2022; 1(95): 167-177. <https://doi.org/10.154521/022876>.

(Особистий внесок здобувача – пошук літератури, проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку. 0,57 авторських аркушів).

Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. Pastoshchuk, A., Yumyna, Y., Zelena, P., Skivka, L. (2021). Survey of plant growth promoting and antagonistic traits in winter wheat grain endophytic bacteria. EUREKA: Life Sciences, T.4: 66–72. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2021.001978>.

(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку. 0,48 авторських аркушів).

2. Pastoshchuk, A., Skivka, L. (2021). Grain-Resided Endophytic Bacteria as Plant Growth Promoting and Biocontrol Agents: Food for Thought. EC Microbiology, 17(6): 57-58.

(Особистий внесок здобувача – пошук літератури, проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку. 0,59 авторських аркушів).

3. Коцюк А.Ю., Буценко Л.Н., Сківка Л.М. Влияние *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на всхожесть и рост семян пшеницы. XI международная научная конференция молодых ученых «Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане», 23-24 ноября 2017 г., Казахстан, с.157-159.

4. Пастошук А.Ю., Сківка Л.М. Хімічний склад ліпополісахаридів збудників бактеріозів зернових культур виду *Pseudomonas syringae*. XIV Міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології», 10-12 квітня 2018 р., Львів. Україна: збірник тез. С.249-250.

5. Pastoschuk A., Butsenko L., Skivka L., Patyka V. The effect of *Pseudomonas syrsngae* pv. *coronafaciens* on the germination of wheat seeds of different varieties. III

International Scientific Conference "Microbiology and Immunology– the development outlook in the XXI Century», April,18-20, 2018, Kyiv, Ukraine: Abstract Book. P.80.

6. Пастошук А., Сківка Л., Буценко Л. Вплив *Pseudomonas syringae* pv.*atrofaciens* на схожість і ріст насіння пшениці сорту Хуторянка. «Тернопільські біологічні читання»,19-21 квітня 2018 р., Тернопіль, Україна: збірник тез. с.121-124.

7. Пастошук А.Ю. Зміни вмісту білка у проростках озимої пшениці різних сортів під впливом *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* «Новини науки XXI століття» 23 листопада 2018 р., Ч. 7., Вінниця, Україна: збірник тез. С.75-77.

8. Пастошук А.Ю, Коваленко М.С., Бацманова Л.М., Сківка Л.М. Вплив *Pseudomonas syringae* на показники оксидативного стресу, активність супероксиддесмутази та катлази в проростках озимої пшениці різних сортів. „Майбутній науковець – 2018”, 14 грудня 2018 р., Сєвєродонецьк, Україна: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю с. 42.

9. Пастошук А., Шустик Д., Качкарова Ю., Зелена П., Юмина Ю. Фізіологічні характеристики та антагоністичні властивості ендofітних бактерій сорту озимої пшениці, стійкого до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch). XIX міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки / Bioscience advances», 12-13 травня 2021р., Київ, Україна: збірник тез. С.46-49.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. БАКТЕРІАЛЬНІ ХВОРОБИ ПШЕНИЦІ ТА КОНТРОЛЬ ЇХ ЗБУДНИКІВ.....	26
1.1 Базальний бактеріоз пшениці: поширення в Україні та шкідливість збудника	29
1.2 Методи контролю збудників бактеріальних хвороб зернових культур.....	32
1.3 Індукована системна стійкість у захисті рослин від фітопатогенних бактерій.....	34
1.3.1 Еліситорна активність ліпополісахаридів	37
1.4 Епіфітна та ендofітна мікробіота у комплексі механізмів стійкості рослин до фітопатогенних бактерій	41
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	49
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
2.1. Фітопатогенні мікроорганізми та умови їх культивування.....	49
2.2. Отримання бактеріального ліпополісахариду.....	49
2.3. Сорти пшениці, використані у дослідженнях	50
2.4. Схема дослідження впливу фітопатогенних бактерій та їх ліпополісахаридів на проростання зерна та ріст проростків пшениці різних сортів	51
2.5. Дослідження впливу фітопатогенних бактерій на систему антиоксидантного захисту проростків пшениці різних сортів.....	52
2.5.1. Визначення активності супероксиддисмутази.....	53
2.5.2. Визначення активності каталази	53
2.5.3. Дослідження вмісту ТБК-активних продуктів	53
2.6. Визначення вмісту проліну	54
2.7. Виділення та характеристика ендofітних мікроорганізмів з пшениці.....	55
2.8. Визначення антагоністичної активності ендofітних мікроорганізмів пшениці щодо <i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	56

2.9. Ідентифікація ендofітних мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо <i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	57
2.9.1. Біохімічна ідентифікація ендofітних мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо <i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	57
2.9.2. Дослідження MALDI-TOF спектру ендofітних мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо <i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	57
2.9.3. Секвенування фрагмента гена 16S рРНК.....	58
2.9.4. Тест на індол	60
2.9.5. Тест на оксидазу.....	61
2.10. Статистичний аналіз даних.....	61
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	62
3.1. Вплив фітопатогенних псевдомонад на проростання зерна та ріст паростків озимої пшениці різних сортів	62
3.1.1. Вплив збудника базального бактеріозу <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1013 на схожість зерна і ріст паростків пшениці різних сортів.....	62
3.1.2. Вплив <i>Pseudomonas. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> на схожість зерна і ріст паростків пшениці різних сортів.....	67
3.2. Вплив патоварів <i>Pseudomonas syringae</i> та їх ЛПС на стан системи антиоксидантного захисту проростків пшениці різних сортів.....	71
3.3. Кількісні та функціональні властивості ендofітних мікроорганізмів зерна озимої пшениці з різною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад та їхніх ліпополісахаридів	79
3.3.1. Кількісні характеристики та морфолого-культуральні властивості ендofітних бактерій зерна пшениці з різною чутливістю до <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	81
3.3.2. Функціональні характеристики ендofітних бактерій зерна пшениці з різною чутливістю до <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	90

3.3.3. Антагоністичні властивості ендofітних бактерій зерна пшениці з різною чутливістю до <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	94
3.3.4. Ідентифікація ендofітних зернових бактерій пшениці з антагоністичною активністю до <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1013.....	97
ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	106
ВИСНОВКИ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	118

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК- активні форми кисню

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ЗМЧ - загальне мікробне число

КА - картопляний агар

КАТ- каталаза

КУО - колоніє утворювальна одиниця

ЛПС - ліпополісахариди

МДА – малоновий диальдегід

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

ОНТ - олігонітротрофи

ПАОК- продуценти індоламнінооцтової кислоти

СОД - супероксиддесмутаза

ТБК –тіобарбітурова кислота

ФСБ - фосфатсолюбілізуючі бактерії

DAMPs (damage-associated molecular patterns) - молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням

НАМР(herbivore-associated molecular patterns) - Молекулярні патерни рослинної комах

ISR (induced systemic resistance) - індукована системна стійкість

MAMP (microbe-associated molecular patterns) - мікробо-асоційовані молекулярні патерни

PAMP (pathogen-associated molecular patterns) - патоген-асоційовані молекулярні патерни

pv (pathovar) - патовар

PR (pathogenesis proteins) -патогенез-асоційовані білки

SAR (systemic acquired resistance)- системна набута стійкість

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Ендофіти - це мікроорганізми, які безсимптомно живуть у різних тканинах рослин і відіграють важливу роль у функціонування рослинного організму, сприяючи його росту і підвищуючи стійкість до абіотичних та біотичних стресів [1, 2]. Ендофітні бактерії чинять сприятливий вплив на рослину-господаря за допомогою різних прямих та непрямих механізмів. Прямі механізми включають продукцію фітогормонів, солубілізацію фосфату, фіксацію азоту, поглинання заліза тощо [3]. Крім того, ендофітні мікроорганізми можуть чинити пряму антагоністичну дію на фітопатогени [4]. Непрямий механізм полягає у здатності ендофітів активувати захисні реакції рослин проти фітопатогенів [5, 6]. Дослідження ендофітів зерна має важливе значення з точки зору екології мікроорганізмів для визначення механізмів рослинно-мікробного симбіозу. Крім того, зазначені властивості ендофітних мікроорганізмів роблять їх привабливими об'єктами для розробки агробіотехнологічних препаратів для покращення властивостей ґрунту та підвищення врожайності сільськогосподарських культур, особливо основних зернових культур, таких як пшениця, рис тощо. У даний час більшість наукових повідомлень зосереджено на виділенні та біотехнологічному використанні ризосферних та корневих ендофітних бактерій [7]. При цьому даних про ендофіти зерна пшениці небагато. Тим не менше, саме зернові ендофіти становлять особливий інтерес з точки зору їх використання в агробіотехнології через їх унікальні властивості, включаючи здатність тривалий час переживати несприятливі умови, пов'язані з умовами зберігання зерна, а також здатність до вертикальної передачі у тканини рослини та визначальну роль у формуванні ендофітної мікробіоти рослинного організму в цілому [8].

Пшениці (*Triticum aestivum* L) належить провідна роль у забезпеченні людства продуктами харчування. На даний час пшениця – одна з найпоширеніших культур у світовому рослинництві, універсальність її полягає в тому, що вона використовується як кормова, технічна та харчова культура. Одержання стабільно

високих врожаїв зерна пшениці є актуальним для сільського господарства України та інших країн. В останні роки все частіше повідомляється про ряд хвороб, які знижують кількість та якість зерна. В цілому втрати врожаю через бактеріальні хвороби пшениці займають третє місце, після грибних та вірусних захворювань. Найчастіше збудниками бактеріальних хвороби пшениці є бактерії групи *Pseudomonas*. Ці бактерії паразитують на широкому колі рослин, включаючи зернові культури (рис, пшеницю, жито, ячмінь), спричинюючи плямистість, пустоколосистість, що призводить до значних втрат урожаю. Основним збудником бактеріальних хвороб пшениці є *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (збудник базального бактеріозу) [9-11]. Україна є одним із семи найбільших експортерів пшениці у світі [12]. Втрати врожаю завдають значних економічних збитків державі. Зважаючи на спрямованість агропромислового комплексу України на пререхід до біологізації землеробства, пошук симбіотичних мікроорганізмів з рїстстимулювальними та антагонїстичними щодо патогенів властивостями є перспективним напрямком у сільськогосподарській мікробіологїї [13].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась в межах науково-дослідної теми. Вирішення проблемних питань різноманїтності та стрес-толерантності представників флори та мікробїоти України за глобальних змін клімату.

Мета і завдання дослідження: пошук мікроорганїзмів у складї ендofїтних угруповань зерна пшениці з антагонїстичною активністю щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Провести порівняльну оцінку чутливості різних сортів пшениці до адаптованих і неадапованих патоварів *Pseudomonas syringae* та їх ліпополїсахаридів.
2. Провести порівняльне дослідження впливу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на стан системи антиоксидантного захисту проростків пшениці різних сортів.

3. Вивчити видовий склад ендofітних мікроорганізмів зерна пшениці сортів з різною чутливістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*.
4. Порівняти рістстимулювальні властивості ендofітних мікроорганізмів зерна пшениці сортів з різною чутливістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*.
5. Дослідити вплив ендofітних мікроорганізмів зерна пшениці на ріст *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens in vitro*.

Об'єкт дослідження: ендofітні мікробні угруповання зерна пшениці.

Предмет дослідження: рістстимулювальні, антагоністичні та імуномодуляторні властивості ендofітних бактерій зерна пшениці.

Методи дослідження: для виконання поставлених завдань у роботі використано мікробіологічні (культивування мікроорганізмів, виділення збудників хвороб у чисту культуру, світлова мікроскопія), фітопатологічні (штучне зараження зернівок фітопатогенними мікроорганізмами, оцінка патологічного стану проростків), біохімічні (біохімічна ідентифікація мікроорганізмів з використанням мікробіологічного аналізатора VITEK® 2Compact), фізико-хімічні (ідентифікація мікроорганізмів з використанням методу MALDI-TOFF мас-спектрометрії), молекулярно-біологічні (виділення ДНК, ПЛР, секвенування фрагмента гена 16S рРНК) та статистичні методи досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Розширено існуючі уявлення щодо різноманітності культурабельних ендofітних бактерій зерна пшениці. Встановлено морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості культурабельних ендofітних бактерій сортів пшениці з різною стійкістю до збудника базального бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*.

Уперше встановлено взаємозв'язок між кількісними та функціональними характеристиками ендofітних бактерій зерна та стійкістю насіння до ураження *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Показано, що висока стійкість до ураження *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* асоційована з високим вмістом у тканинах зернівок культурабельних бактерій і значною часткою у складі ендofітних

угруповань бактерій з антагоністичною активністю щодо фітопатогенних псевдомонад. Переважаючими морфотипами зерна стійких сортів є споротвірні бацили та грамнегативні палички, серед яких присутні ізоляти, що володіють одночасно трьома рістстимулювальними властивостями: олігонітротрофією, здатністю солюбілізувати фосфати та продукувати індольні сполуки.

Отримано нові дані щодо підтримання оксидантно-антиоксидантного балансу, як одного з механізмів стійкості зернівок пшениці до шкодочинної дії *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Встановлено, що підтримка оксидантно-антиоксидантного балансу у відповідь на експозицію фітопатогеном асоційована з високим базальним вмістом проліну у складі тканин проростків.

Практичне значення одержаних результатів.

Зі складу ендofітних бактеріальних угруповань зерна пшениці виділено та ідентифіковано до роду ізоляти, які володіють прямою антагоністичною активністю щодо *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Окремі виділені штами ендofітних бактерій з антагоністичною активністю володіють одночасно рістстимулювальними властивостями, що робить їх перспективними об'єктами для розробки агробіотехнологічних препаратів для контролю збудників бактеріальних хвороб та підвищення стійкості сортів пшениці до абіотичних стресів.

Результати дисертаційного дослідження використовуються в навчальному процесі кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при викладанні дисциплін «Фітопатогенні бактерії».

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною роботою автора. Автором особисто одержано основну частину експериментального матеріалу, викладеного в дисертації, а саме: виділено препарати ЛПС; досліджено вплив клітин фітопатогенних псевдомонад *P. syringae* pv. *atrofaciens* та *P. syringae* pv. *coronafaciens* та їх ЛПС на систему антиоксидантного захисту в проростках пшениці, а також виділено культурабельні ендofітні бактерії зернівок пшениці, охарактеризовано їх морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості, виділено та ідентифіковано ізоляти ендofітних бактерій з

антагоністичною активністю до *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Автор висловлює також глибоку вдячність за надання культур фітопатогенних псевдомонад та консультативну допомогу завідувачу відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України д.б.н., професору, академіку НААН України В.П.Патиці, старшому науковому співробітнику відділу фітопатогенних бактерій д.б.н. Л.М.Буценко, асистенту кафедри біології рослин ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, к.б.н. М.С.Коваленко – за допомогу у дослідженні оксидантно-антиоксидантної системи проростків пшениці, співробітникам кафедри мікробіології та імунології асистенту кафедри, к.б.н. Ю.М. Юміні, асистенту кафедри к.б.н. Ю.В. Файдюк та П.П.Зеленій – за допомогу у виділенні та дослідженні ендofітних бактерій. Аналіз та інтерпретацію результатів, формулювання основних положень і висновків, підготовку до друку наукових праць проведено разом з науковим керівником д.б.н., проф. Л.М.Сківкою. Співучасть колег у виконанні роботи засвідчена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації.

Результати дисертаційної роботи було представлено на XV Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/ BioScience Advances» (18-21 квітня 2018, Київ); XIV Міжнародній науковій конференції "Молодь і поступ біології" (10-12 квітня 2018, Львів); 22-й международной Пуштинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (23 – 27 апреля 2018, Пушино, Росія); XI международной научной конференции молодых ученых «Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане» (23-24 ноября 2017 , Казахстан); XXIV Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції (23 листопада 2018, м. Вінниця); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Інноваційні агротехнології» (28 березня 2018, Умань); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Майбутній науковець» (14 грудня 2018, Северодонецьк); Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 20-річчю заснування Голицького біостаніонару Тернопільського національного педагогічного

університету імені Володимира Гнатюка (19-21 квітня 2018 р., Тернопіль); XIX міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна : Досягнення біологічної науки / Bioscience advances» (12-13 травня 2021, Київ); Вісник КНУ Ім. Т.Г.Шевченка (12 травня 2021, Київ), Наукові доповіді НУБіП України (27 лютого 2022, Київ).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 праць: 6 статей у вітчизняних та закордонних наукових фахових виданнях, з них 2 статті у наукових виданнях держав, що входять до ЄС, та одна стаття у виданні, що індексується WoS; 9 тез наукових доповідей на закордонних та вітчизняних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Загальний обсяг дисертації складає 143 сторінок, основну частину роботи викладено на 116 сторінках. Робота ілюстрована 8 таблицями та 17 рисунками. Перелік використаних джерел літератури налічує 203 найменування, з них кирилицею - 26, латиницею -177.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

БАКТЕРІАЛЬНІ ХВОРОБИ ПШЕНИЦІ ТА КОНТРОЛЬ ЇХ ЗБУДНИКІВ

Пшениця (*Triticum aestivum* L.) займає провідне місце серед зернових культур у всьому світі та в Україні, а виробництво зерна в Україні – стратегічна галузь народного господарства. На даний момент наша країна входить до десятки найбільших країн -виробників пшениці у світі [14]. Зростання світового попиту на зернові в якості продуктів харчування та кормів, а також як джерело біопалива вимагає отримання високих врожаїв цієї зернової культури.

Не зважаючи на доволі сприятливі кліматичні умови для вирощування пшениці в Україні, значних економічних збитків завдають шкідники, гриби, віруси і бактеріальні хвороби [15]. В останні 10 років відзначається тенденція до зростання ураженості пшениці збудниками бактеріозів [16,17,18]. Основні бактеріальні хвороби пшениці можуть бути зумовлені наступними видами: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (базальний бактеріоз пшениці), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (бактеріальна плямистість), *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (чорний бактеріоз), *Pectobacterium carotovorum* (бактеріальна гниль), *Pseudomonas cichorii* (стебловий меланоз), *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* (бактеріальна мозаїка), *Pseudomonas fluorescens* (плямистий бактеріоз), *Pantoea agglomerans* (бактеріальна плямистість), *Erwinia rhapontici* (рожевий бактеріоз зерна), *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* (біла плямистість) та інші. Фітопатогенні бактерії уражують зернові культури і зменшують їх урожай на 40%, а в роки епіфітотій - більш, ніж на 70 % (табл.1.1.) [19,20], чим завдають значних економічних збитків і потребують швидкого та ефективного вирішення проблеми бактеріозів в Україні та в світі.

Бактеріальні хвороби пшениці та їхні збудники

Бактеріальна хвороба	Збудник
<i>В Україні:</i>	
Базальний бактеріоз (базальна гниль лусочок, базальна плямистість лусочок, гниль колоска)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Atrofaciens</i>
Бактеріальний опік (бактеріальна плямистість, некроз листя)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i>
Чорний бактеріоз (блек-чаф, чорноплівчастість, штрихуватість)	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i> , <i>X. translucens</i> pv. <i>Cerealis</i>
Бактеріальна гниль (стеблова гниль)	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
Плямистий бактеріоз	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Бактеріальна плямистість	<i>Pantoea agglomerans</i>
Рожевий бактеріоз зерна	<i>Erwinia rhapontici</i>
<i>У світі:</i>	
Жовтий слизовий бактеріоз	<i>Rathayibacter tritici</i>
Біла плямистість	<i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>Cerealis</i>
Стебловий меланоз	<i>Pseudomonas cichorii</i>
Бактеріальна мозаїка	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i>
Бактеріальне гниття піхв	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>

Найчастіше пшеницю уражують збудники чорного і базального бактеріозів [11].

Чорний бактеріоз (*Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*). *Xanthomonas translucens* - це вид грамнегативних бактерій, які уражують всі органи рослин

пшениці у стадії вегетації, з утворенням прозорих смуг, що з часом стають жовтими і бурими, які збільшуються в розмірах, стають хлорозними, темно-жовтими, коричневими з чорною облямівкою [21]. На стеблі біля основи листкової піхви утворюються чорно-коричневі плями або коричневі поздовжні смуги, які можуть поширюватися по всьому стеблю. Найчастіше хвороба уражує колоски у вигляді чорних і бурих плям чи смуг у верхній частині лусочок або по всій поверхні лусочки. За сильного ураження хворобою колос зменшується, деформується, ості викривляються, розвивається плюскле зерно. У природних умовах у вологу погоду на зерні виступає ексудат у вигляді слизу білуватого або жовтуватого кольору, який під час підсихання перетворюється на гранули або сіру масу. Захворювання вперше було зареєстровано на ячмені [22,23] в США, патогени були названі *Bacterium translucens* і *B. translucens* var. *undulosum* відповідно. *X. translucens* був виявлений майже у всіх районах вирощування пшениці та ячменю. Збудник може викликати значну втрату врожаю і зниження якості зерна [21].

Штами *X. translucens*, що спричинюють хвороби зернових, були класифіковані в групу - *translucens* [24]. Група *translucens*, як вважали, містить три справжніх біологічних патовари, *cerealis*, *translucens* і *undulosa*. Рv. *translucens*, адаптований для ячменю, рv. *undulosa*, як для ячменю, так і для пшениці, і рv. *cerealis* - для ячменю, пшениці та вівса [21]. В усіх випадках симптоми хвороби подібні. *X. translucens* рv. *undulosa* зустрічається на пшениці частіше, ніж на ячмені і житі. *Xanthomonas translucens* трапляється в усіх регіонах України, в яких сіють пшеницю [11].

Шкідливість чорного бактеріозу полягає у зменшенні кількості та довжини колосків, числа зернівок у колосі, що призводить до погіршення якості та зменшення кількості зібраного урожаю. Урожай зернових культур знижується на 15 - 90% залежно від сорту й ґрунтово-кліматичних умов. Утворення плюсклого зерна призводить до зниження маси зерен на 60–62%. Розвитку хвороби зернових культур сприяють висока відносна вологість повітря – 70–80% і температура 25 - 30°C.

Хвороба, яку спричиняє *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 на пшениці, отримала назву базальний бактеріоз пшениці, базальна гниль лусочок, базальна плямистість лусочок, гниль колоска, «basal glume rot». *P. syringae* pv. *atrofaciens* є основним збудником бактеріальних хвороб пшениці не лише в Україні, а й в інших країнах світу [25]. Вперше дану хворобу описав та виявив збудника Мак-Кулоч у 1920 р. в різних регіонах США та Канади. З того часу збудника описують, як потенційно небезпечного для зернових культур. Збудника хвороби було ізольовано з нижньої частини лусочок і зерна, що мали коричневе та чорне забарвлення, внаслідок ураження бактеріями. Уражене збудником насіння повністю втрачає схожість, з нього виділяється білуватий ексудат, який з часом набуває неприємного запаху. З часу виявлення *P. syringae* pv. *atrofaciens* є декілька підтверджених повідомлень про спричинені ним епіфітотії у Південній Дакоті (США) [26, 27, 28].

Характерна ознака цієї хвороби – ураження нижньої частини лусочки. Однак у процесі вегетації трапляються ураження верхньої її частини та плямистості різних частин рослини. Уражене збудником зерно пшениці на зародковому, або базальному кінці має плями від світло-коричневого до вугільно-чорного кольору. Хоча цей симптом характерний для ураження *P. syringae* pv. *atrofaciens*, він не є специфічним і може траплятися за ураження зерна іншими збудниками, такими як *Bipolaris sorokiniana* і *Alternaria alternata* [29].

1.1. Базальний бактеріоз пшениці: поширення в Україні та шкідливість збудника

Найпоширенішим і найнебезпечнішим збудником бактеріальних хвороб пшениці в Україні є *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* [30] - збудник базального бактеріозу. Базальний бактеріоз характеризується широкою розповсюдженістю і спричиняє значне зниження врожаю пшениці. На зернових культурах паразитують такі патовари: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (збудник базального

бактеріозу), *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* (збудник ореольного опіку), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (збудник бактеріального опіку) [30]. *P. syringae* pv. *atrofaciens* уражує всі частини рослин та насіння, спричинює плямистість і пустоколосість, що призводить до втрати врожаю та зниження його якості [11]. До *P. syringae* pv. *atrofaciens* чутливе широке коло рослин, у т.ч. зернові, а також деякі бобові, пасльонові, інші злакові та бур'яни [31]. Найбільше базальний бактеріоз розповсюджений у північних та східних областях України рис.1.1. [19].



Рис. 1.1. Карта-схема виявлення *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на пшениці та житі (за даними співробітників відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАНУ).

■ області України, у яких було виявлено збудник

На початкових етапах захворювання уражуються листки, колос, зерно стебла, після чого на листових пластинках і у піхвах листків утворюються спочатку водянисті, згодом темно коричневі плями рис 1.2. [19]. Уражені бактерією листки передчасно жовтіють та відмирають. На стеблах загниває їх основа, рослини відстають у розвитку та рості. Колосові лусочки з внутрішнього боку буріють після чого чорніють біля основи. На зернівках чорніє зародок. Після інтенсивного розвитку хвороби, спостерігається карликовість рослин, суцільне почорніння

колосових лусочок, суха гниль піхв листків. Уражені зернівки біля зародка чорніють, а інша її частина стає червоною.

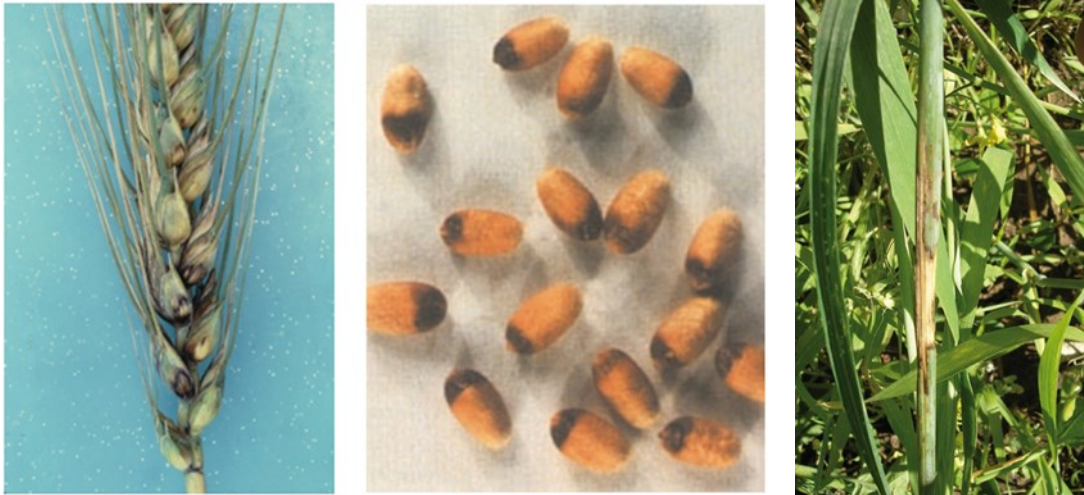


Рис. 1.2. Симптоми базального бактеріозу пшениці, спричиненого *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Основні прояви базального бактеріозу: зниження схожості ураженого насіння, зрідження посівів та як результат відмирання уражених рослин. В уражених рослин фаза кущіння суттєво уповільнюється, спостерігається недорозвинення рослин і пустоколосість такі рослини пізно виходять у трубку. Бактерії можуть рости у широкому діапазоні температур: від 2°C до 37°C (оптимальна температура 25–28°C)[19]. Крім пшениці, бактерії уражують, ячмінь, жито, а також інші злакові культури. Інфекція поширюється механічним шляхом під час вегетації рослин. Основне джерело інфекції — заражене насіння злакових культур і злакових бур'янів. Збудник зберігається у зараженому насінні до 3-ох років, також може зберігатися у неперегнилих рештках. Розвитку та прогресуванню хвороби сприяють м'яка зима, часті дощі весною і влітку, висока вологість у фазі колосіння-молочної стиглості зерна, висока температура повітря по весні і понижена у фазі наливання зерна. Більш інтенсивний розвиток базального бактеріозу зафіксовано під час сівби пшениці після пшениці і гороху. Враховуючи загальний накопичений запас інфекції на неперегнилих рештках, інфікованих рослинах пшениці та інших злакових культур, що перезимували, очікується широкий спалах прояву хвороби, а за сприятливих оптимальних умов температури (25–28°C), частих дощів із поривами вітру, вологості ґрунту у фазі

наливу зерна можливий прояв хвороби в Лісостепу від низького до помірного. В Україні вивчені бактеріальні хвороби багатьох видів рослин, в т.ч. зернових, зернобобових, плодових, лісових культур, каучуконосів, овочевих, буряків цукрових, бавовнику, тютюну, женьшеню, та суданської трави. Аналіз збудників бактеріальних хвороб рослин вказує, що на одному виді рослин можуть паразитувати, в основному, від 2-ох до 13-ти видів фітопатогенних бактерій. В залежності від сорту рослин, системи землеробства, умов навколишнього середовища, внесення пестицидів проходить перерозподіл і домінування збудників бактеріальних хвороб. В наш час проблема взаємного впливу мікро- та макроорганізмів все більше привертає увагу дослідників з усього світу. Розуміння механізмів взаємодії про- та еукаріотів важливо для розроблення підходів до попередження та лікування захворювань. В останнє десятиліття особливу увагу у цих процесах дослідники звертають на роль окремих структурних компонентів клітин бактерій та їхніх метаболітів.

1.2. Методи контролю збудників бактеріальних хвороб зернових культур

Розробка ефективних методів контролю збудників бактеріальних хвороб базується на врахуванні біологічних властивостей цих бактерій. Найчастіше джерелом інфекції є рослинні рештки, насіння, бактеріальні збудники переносяться водою та потоками повітря. Інфекція насіння виникає в результаті механічного забруднення бактеріями або шматочками ураженої тканини рослин, які містять у собі патогени (наприклад, насіння залишене, як посівний матеріал та ін.). Внутрішню інфекцію насіння викликають бактерії, які проникають у тканини ураженої рослини, ці бактерії потрапляють в насіння і проникають у судини, призводячи до зараження. Досить часто можна візуально визначити, що насіння уражене фітопатогеном: плюскле насіння з темними плямами або жовтуватим нальотом, часто деформоване, слизьке з неприємним запахом гнилі. У багатьох випадках встановити, що було висіяне інфіковане насіння, можна вже під час вегетації культури і то після кількох обстежень. Щоб убезпечитись від такої

ситуації, варто перед посівом насіння провести його лабораторний аналіз, особливо тоді, якщо посівний матеріал отримано з рослин, які виростили у районах із неблагополучним фітосанітарним станом. Основними переносниками фітопатогенних бактерій є комахи, птахи, а також людина. Також можливе поширення бактерій від рослини до рослини повітряними течіями, вологою (з дощем). Розроблення заходів контролю збудників бактеріальних хвороб базується на дослідженні способу зараження рослин бактеріями (джерела первинної інфекції) та шляхів розповсюдження інфекції [19].

Профілактичні заходи контролю бактеріозів повинні застосовуватись у комплексі та включати: управління рослинними рештками, дотримання сівозміни, необхідно проводити глибоку зяблеву оранку, своєчасну боротьбу з бур'янами та шкідниками (останні можуть не лише залишати пошкодження, що стануть вхідними воротами інфекції, але й слугувати переносниками бактерій), протруєння насіння, звільняти насіння від гал пшеничної нематоди, дотримання правил зберігання насіння, оптимальні терміни сівби, застосування стійких сортів чи гібридів, режимів температури і вологості в захищеному ґрунті тощо. Усе це спрямовано на створення оптимальних для рослин умов росту й розвитку. В Україні на сьогодні немає спеціальних препаратів для рослинництва з антибактеріальною активністю. Аграрії проти збудників бактеріальних хвороб застосовують фунгіциди, які можуть також мати антибактеріальну активність. Фунгіцидами із антибактеріальним ефектом є фосфіт алюмінію, манкоцеб та манкоцеб у комбінації з металаксілом. У всьому світі для контролю особливо небезпечних збудників бактеріальних хвороб рослин використовують антибіотики. Оскільки хімічні препарати часто шкідливі не тільки для патогенів, але й для рослини-хазяїна, погіршують екологічну обстановку, частково накопичуючись в ґрунті, в останні роки велика увага приділяється біопрепаратам для захисту рослин від хвороб. Так штам *Pantoea agglomerans* ЕНО-10 ефективний проти бактерій родів *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium* і *Corynebacterium*. Для контролю збудників бактеріальних кореневих гнилей зернових культур рекомендують препарат бактофіт, основою якого є *Bacillus subtilis* [32]. Для захисту

від найбільш шкідливих бактеріальних хвороб пшениці, які спричиняють *P. syringae* pv. *atrofaciens*, використовують тірамвісні препарати в комплексі з фітолавіном 300. Фітолавін 300 є чи не єдиним ефективним препаратом для захисту ряду культур від збудників бактеріозів [33]. Препарат найбільш ефективний при обприскуванні рослин в фазі початку виходу колосу в трубку. Після обробки таким препаратом насіння, демонструє підвищену врожайність (в випадку епіфітотії бактеріозів – до 69–80%), максимально знижується інфікованість, а також значно покращується якість зерна. В Україні немає зареєстрованих для використання у рослинництві антибіотиків, що з урахуванням значного зростання резистентності мікроорганізмів до антибіотиків є цілком виправданим заходом. На зміну хімічним препаратам у захисті від фітопатогенних бактерій чудовою альтернативою можуть стати біологічні препарати на основі бактерій-антагоністів. Підтверджено антагоністичну активність бактерій родів *Bacillus* і *Streptomyces* до фітопатогенних бактерій. А біопрепарати на їхній основі можна рекомендувати застосовувати для контролю збудників бактеріальних хвороб [19].

Отже, перспективним є застосування біологічних препаратів для контролю фітопатогенних бактерій, які уражують пшеницю. Разом із тим, асортимент таких препаратів є досить обмеженим, що спонукає до пошуку нових продуцентів. При цьому увагу необхідно приділяти антагоністам, що характеризуються не лише високою антибактеріальною активністю, а й мають позитивний вплив на рослини пшениці.

1.3. Індукована системна стійкість у комплексі механізмів стійкості рослин до фітопатогенних бактерій

Індукована стійкість - це фізіологічний "стан підвищеної захисної здатності", викликаний стресовими стимулами навколишнього середовища (хімічними, фізичними, біотичними), завдяки чому вроджений захист рослини посилюється проти подальших біотичних стресорів, таких як фітопатогенні бактерії, гриби, шкідливі комахи тощо. Індукована резистентність може бути як локальною, так і

системною, і може індукуватися обмеженою (локальною) патогенною інфекцією, авірулентними збудниками, деякими непатогенними бактеріями, деякими фізичними впливами та деякими хімічними речовинами. Цей підвищений стан стійкості ефективний проти широкого кола патогенів та паразитів і тому є неспецифічним [34-35]. Індукована резистентність була особливо добре вивчена у тютюну, огірків та арабідопсису. Загальний механізм формування індукованої резистентності наступний. Під впливом локально діючого стимулу генерується рухливий сигнал (розчинна сигнальна молекула), який передається в інші частини рослини, де він посилює механізми для обмеження зараження, росту, розмноження та поширення грибних, бактеріальних та вірусних хвороб [36]. На сьогоднішній день найбільш чітко визначені дві форми індукованої резистентності - це системна набута резистентність (systemic acquired resistance, SAR) та індукована системна резистентність (induced systemic resistance, ISR), які можна диференціювати на основі природи еліситорів та задіяних регуляторних шляхів. SAR може бути викликана дією на рослини вірулентних, авірулентних мікроорганізмів, а також фізичного поранення її тканин. Залежно від сигнальних шляхів, які активуються в організмі рослини, розрізняють SAR, спричинену ненекротизуючими фітопатогенами, та SAR, викликану некротизуючими патогенами та/або пораненням рослини (залежну від некрозу). В обох випадках формування SAR пов'язане з накопиченням так званих патогенез-асоційованих білків (pathogenesis proteins, PR) з анти патогенною активністю. До PR належать ферменти з протигрибною активністю (хітинази, глюконази, тауматини), оксидативні ферменти (пероксидази, поліфенол оксидази, ліпоксигенази, каталаза, супероксиддисмутаза тощо) [37] та низькомолекулярні сполуки з антимікробною активністю (фітоалексини). В умовах SAR, викликаній ненекротизуючими фітопатогенами, накопичення PR залежить від сигнальної молекули - саліцилової кислоти. В умовах SAR, спричиненої патогенами, що викликають гіперчутливий некроз, або фізичною травмою рослини, накопичення PR залежить від сигнальних механізмів, опосередкованих жасмоновою кислотою та етиленом [38,39].

На відміну від SAR, формування ISR не супроводжується синтезом і накопиченням PR. Формування ISR викликають симбіотичні бактерії рослини-хазяїна. На сьогоднішній день у літературі найбільш детально описано формування ISR, яку індують ризобактерії. Механізми формування індукованої системної резистентності, викликані симбіотичними бактеріями практично не досліджені. Невідомі також ефекторні молекули, які опосередковують цю форму системної резистентності рослини. Симбіотичні мікроорганізми не викликають пошкодження тканин рослини, не спричиняють некрозів. Висловлюються припущення про те, що механізм системної індукованої резистентності, активованої симбіотичними мікроорганізмами, подібний до аналогічного механізму у тварин. Зокрема, вважається, що мікробо-асоційовані молекулярні патерни симбіотичних бактерій, такі як ліпополісахариди або флагелін, здатні зв'язуватися зі специфічними рецепторами рослинних клітин і викликати синтез ними сіалової кислоти та жасмонової кислоти, які, у свою чергу, ініціюють синтез патогенез-асоційованих білків в умовах інокуляції патогеном [40, 41, 42]. У будь-якому випадку, наявність симбіотичних ризобактерій доказово асоціюється з підвищеною стійкістю рослини до фітопатогенів. У літературі останніх десяти років описано здатність формувати підвищену стійкість до патогенів для деяких епіфітних та ендоефітних мікроорганізмів [43, 44]. Здатність ендоефітної мікробіоти забезпечувати стійкість рослини до фітопатогенів вивчена лише для деяких рослин [45-46.] Дослідження протективних властивостей ендоефітної мікробіоти сільськогосподарських рослин найбільшою мірою стосується рису, дещо менше – ячменю [47-48.]. Здатність ендоефітних бактерій пшениці індукувати реакції стійкості рослин практично не досліджена.

Стійкість до основних біотичних і абіотичних стресів - одна з основних вимог, які висуваються до сучасних сортів сільськогосподарських культур і технологій їх вирощування. Для досягнення стабільного результату в мінливих умовах зовнішнього середовища важливо не лише правильно вибрати сорт, а й застосувати прийоми обробітку, здатні максимально мобілізувати потенційні захисні сили організму рослин. Для багатьох сільськогосподарських культур

проблема комплексної тривалої стійкості до стресових факторів біотичної і абіотичної природи досі залишається невирішеною, тому для отримання задовільної врожайності доводиться використовувати хімічні засоби захисту рослин. Вивчення механізмів стійкості та чинників їх активації у рослин відкриває нові перспективи для підвищення врожайності сільськогосподарських культур та впровадження екологічного землеробства.

1.3.1. Еліситорна активність ліпополісахаридів

Подібно до тваринних організмів, захист рослинного організму від ураження вірусами, бактеріями, грибами та паразитами (рослиноїдними комахами) складається із трьох ліній. Фізичний бар'єр клітинної стінки у рослин служить першою лінією захисту. Цей структурний захист запобігає вторгненню у рослину патогенів та хижаків. Надземні частини рослин вкриті кутикулою з кутину - складного полімеру, багатого етерифікованими похідними жирних кислот, покритого воском. Кутикула формує захист від втрати води, опромінення та ксенобіотиків і бере участь у розмежуванні органів під час розвитку. При зараженні рослини здатні реагувати на зміни в кутикулі, що стимулює активацію захисних реакцій [49]. Однією з перших захисних реакцій рослини, що індукується пошкодженням кутикули, є синтез активних форм кисню (АФК), котрі чинять потужну бактерицидну дію, а також виконують функцію важливих сигнальних молекул [50]. Коли патогени та комахи долають першу лінію захисту, вона ініціює другу лінію захисту, яка знищує хворобу і шкідника, мінімізуючи структурні пошкодження за межами місця зараження та пошкодження тканин. Друга лінія захисної системи рослини зумовлена здатністю рецепторних структур розпізнавати певні патогени та комахи через їх секретони та інші молекулярні структури, які отримали загальну назву еліситорів [51]. Еліситори - це низькомолекулярні сполуки, які викликають імунну відповідь рослин, активуючи каскад сигналів, наслідком яких є синтез антимікробних сполук. Еліситори класифікуються за походженням і за природою на різні типи. За походженням розрізняють два типи

елісаторів: зовнішні або екзогенні (ті, що походять від патогенів), та внутрішні або ендогенні (ті, що утворюються в рослинному організмі внаслідок дії стресорів). Елісатори патогенів – це молекулярні структури або патерни, які є невід'ємними структурними компонентами вірусів, бактерій або грибів (наприклад, пептидоглікан, флагелін, ліпополісахарид, двониткова РНК тощо) або характерними метаболітами патогенів. Вони об'єднані під назвою патоген-асоційовані молекулярні патерни (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) або мікробо-асоційовані молекулярні патерни (microbe-associated molecular patterns, MAMP). Молекулярні патерни рослиноїдних комах об'єднано в окрему групу НАМР – herbivore-associated molecular patterns [52]. PAMP (MAMP) та НАМР є так званими первинними біогенними елісаторами, що приводять у дію складну мережу процесів індукції і регуляції фітоімунітету у випадку інфекції/інвазії. Стресові біогенні та абіогенні впливи на рослину спричиняють появу ендогенних або вторинних елісаторів. Вторинні елісатори утворюються за ферментативного розщеплення високомолекулярних сполук кутикули і полісахаридів клітинних стінок рослин і мікроорганізмів. Таким чином, вторинні ендогенні елісатори – це метаболіти патогенів або продуктів фізіолого-біохімічних процесів, що відбуваються в інфікованих тканинах рослин. До елісаторів цього типу відносять білки, полієнові жирні кислоти, церебросиди, олігоцукрові продукти гідролізу хітину і бета-1,3- глюканів, пектинових речовин і геміцелюлоз клітинних стінок рослин і патогенів. Деякі елісатори утворюються за деградації кутину, полісахаридів і білків клітинних стінок під впливом гідролаз, що виділяються патогеном для забезпечення свого вуглеводного та азотного живлення [53]. Зважаючи на те, що поява вторинних або ендогенних елісаторів пов'язана зі стресовими (травматичними) впливами на рослину, усі вони поєднані загальною назвою молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням – Damage-associated molecular patterns (DAMPs).

За природою розрізняють біогенні та абіогенні елісатори. До біогенних елісаторів належать перелічені вище PAMP (MAMP) та НАМР. До числа абіогенних елісаторів відносять речовини, які не беруть участь у процесах

патогенезу, але викликають захисні відповіді рослин. Це, наприклад, іони важких металів, інгібітори окремих ланцюгів метаболізму, фенольні сполуки та деякі антибіотики, хінони, низка фунгіцидів, УФ-радіація. Наразі абіогенними елісаторами заявлені такі діючі речовини пестицидів: беноміл, стробілурини (азоксістробін, крезоксім – метил, трифлуксістробін, піраклостробін, пікоксістробін, флуаксастробін), тебуконазол та ін. Так, іони важких металів викликають у рослин картоплі накопичення фітоалексинів, але їх утворюється дуже мало. Одна з можливих причин абіотичної індукції захисних реакцій полягає в тому, що абіотичні елісатори активізують ендogenousні гідролази рослинних тканин – нуклеази, пептидази, глюканази й інші ферменти, які відповідають за деградацію біополімерів. Останні здійснюють функції зберігання, передачі та реалізації інформації. Руйнування біополімерів індукує захисні ефекти рослинної тканини. Порівняно із біогенними абіогенні речовини індують захисні реакції рослин у високих концентраціях. Інколи вони викликають у рослин низку побічних ефектів, які не відносяться до процесів патогенезу. До елісаторів відносяться також різноманітні сполуки, що утворюються у результаті експресії захисних генів і беруть участь у формуванні системного імунітету рослин. Такими системними елісаторами є жасмонат, метилжасмонат, саліцилова, абсцисова кислоти та ін. Елісатори належать до різних класів хімічних сполук. Більшість описаних є вуглеводами, пептидами, ліпідами, глікопротеїнами, гліколіпідами [54].

Елісаторні молекули бактеріального походження налічують широке коло PAMP: пептидоглікан, флагелін, фактор елонгації Ef-Tu, білковий комплекс інжектосоми (тип III секреції, властивої грам-негативним бактеріям, у т.ч. бактеріям роду *Pseudomonas*), ліпопептиди, екзополісахариди тощо. Типовим PAMP є бактеріальний ЛПС [55]. PAMP, такі як ЛПС, здатні викликати PAMP-індуковану імунну відповідь рослин (PAMP-triggered immunity, PTI) [56]. ЛПС є невід'ємним структурним компонентом грамнегативних бактерій. Він відіграє важливу роль для росту та виживання бактерій [57]. Структурно ЛПС - це глікокон'югат, трьохкомпонентна молекула, що складається з гідрофобної ліпідної частини (ліпід А), основного олігосахариду та О-полісахаридної частини (OPS)

[58]. Незважаючи на те, що для багатьох МАР ідентифіковані та описані патерн-розпізнавальні структури у рослин [59], розпізнавальні структури у рослин, відповідальні за взаємодію з ЛПС, залишаються маловідомими [60]. Тим не менше, достеменно відомо, що ЛПС різних видів бактерій може викликати або потенціювати РТІ, окремі джерела літератури описують механізми такої дії [61, 62]. Повідомляється, що ЛПС при взаємодії з рослинними клітинами швидко інтерналізуються (поглинаються за рахунок активації рецепторів ендодитозу, будова і сигналінг яких, як припускається, подібні до CD14/TLR4 сигналінгу у тварин і людини у відповідь на взаємодію з ЛПС) та викликають окислювальний сплеск, вироблення NO, приплив кальцію, алкалізацію позаклітинного середовища, активацію синтезу фітоалексинів – антимікробних сполук рослин, посилення експресії PR-генів та зміни клітинної стінки, що включають відкладення калози та фенольних речовин. Імовірним рецептором ендодитозу, відповідальним за інтерналізацію ЛПС, є рецептор флагеліну FLS2, який належить до великої родини рослинних рецептор-подібних кіназ [63]. Відомо також, що ліпід А та OPS-фрагменти ЛПС викликають такі самі захисні реакції рослини, як і повна молекула ЛПС, однак менші за інтенсивністю. Це дозволяє припустити, що зазначені структурні компоненти ЛПС є лише частковими антагоністами відповідних патерн-розпізнавальних структур [64]. Вплив на рослинні клітини бактеріального ЛПС часто асоціюється з ініціацією реакції надчутливості (hypersensitivity reaction, HR), форми запрограмованої загибелі клітин (programmed cell death, PCD) [65]. Програмована клітинна загибель - це активний клітинний процес, який полегшує видалення небажаних або пошкоджених рослинних клітин. Це має важливе значення для диференціації тканин та розвитку рослин [66]. Однак, здатність ЛПС індукувати PCD більше властива їх ефектам на однодольні рослини і не характерна для їх впливу на дводольні. Натомість, одним із ефектів ЛПС, описаного при їх дії на дводольні рослини, є їх здатність запобігати виникненню HR [67]. Незважаючи на значні успіхи, досягнуті у розшифруванні механізмів реакції рослинних клітин на експозицію одним з найбільш типових МАР, властивих як патогенним так і симбіотичним рослино-асоційованим бактеріям, значна кількість питань

залишаються нез'ясованими. Зокрема, потребує вивчення будова і сигнальний каскад розпізнавальних структур, відповідальних за активацію захисних реакцій рослин у відповідь на бактеріальний ЛПС. З'ясування цього питання відкриє нові можливості для формування індукованої стійкості рослин до інфекцій, спричинених грамнегативними бактеріями, що дасть змогу використовувати біотичні тригери такої стійкості, як важливий компонент біологізації та екологізації сільськогосподарського виробництва.

1.4. Епіфітна та ендofітна мікробіота у комплексі механізмів стійкості рослин до фітопатогенних бактерій

Рослини, мікроорганізми та гриби усе своє життя співіснують між собою в особливій, неоднорідній екологічній ніші – фітосфері, яка складається з трьох шарів. Ризосфера (зона впливу кореневої частини рослини на субстрат), ендосфера (тканини рослини), та філосфера (сукупності усіх надземних поверхонь рослини). Надземні поверхні рослини заселяє велика кількість різних мікроорганізмів, серед яких є бактерії, дріжджі, водорості, міцеліальні гриби, найпростіші та нематоди. Поняттям філосфера об'єднується сукупність усіх надземних поверхонь рослини. Самі поверхні рослин називаються філопланом, а мікробіота, яка їх населяє, – мікроепіфітами, або епіфітами. Більшість з вищезгаданих мікроорганізмів не лише не викликають захворювання рослин, а навпаки сприяють їхньому розвитку і росту. Філосфера відокремлена від ендосфери кількома мкм товщі поверхневого шару клітин епідермісу. Умови існування мікроорганізмів, спосіб їх життя, мікробний склад та екологічна форма існування мікроспільнот філосфери значно відрізняється від ендосфери [68.] Філосфера належить до екстремальних екологічних ніш та характеризується жорсткими умовами існування мікроорганізмів, зокрема, щодо доступності температурного режиму і вологи.

Таким чином епіфіти заселяють поверхню рослин, де вони вільно живуть і розмножуються. Епіфітна мікробіота в основному це- неспорутворюючі бактерії,

які становлять 80-99 % загальної кількості мікроорганізмів, а також гриби родів *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, та ін. 2-3 % епіфітної мікробіоти складають цвілеві гриби родів *Penicillium* і *Aspergillus*. Джерелом епіфітів є повітря, дощові та ґрунтові води, а також комахи. Листки є найбільш колонізованою надземною частиною рослин епіфітними мікроорганізмами. Бактерії вважають найрізноманітнішими і найпоширенішим представниками епіфітної мікробіоти листків рослин. Кількість культурабельних епіфітів, що виявляються на поверхні листя рослин коливається від 10^2 до 10^{12} клітин на грам сирої маси листків. Поверхня листя наземної рослинності планети, що займає приблизно $6,4 \times 10^8$ км², це основне середовище існування мікробів і містить орієнтовно 10^{26} бактеріальних клітин [69,70]. Дослідивши культурабельні мікроорганізми цукрових буряків (*Beta vulgaris*) протягом цілого вегетаційного сезону, побачили, що їх листки містять понад 78 видів бактерій, включаючи 37 відомих родів бактерій [71]. Подібні дослідження, які були проведені на пшениці, показали 90 видів бактерій, що належать до 38 родів [72].

Серед непатогенних для рослин епіфітних мікроорганізмів зустрічаються і представники роду *Pseudomonas*, у т.ч. *Pseudomonas syringae*. Серед штамів *Pseudomonas syringae*, які було знайдено на багатьох видах культурних рослин, зустрічаються штами, здатні до продукції токсину сірінгоміцину. Цей токсин бере безпосередню участь у транспорті іонів із цитоплазматичної мембрани через іонні канали та у вивільненні поживних речовин із клітини. Сірінгоміцин називають фактором вірулентності, проте епіфітні мікроорганізми продукують його у невеликих кількостях, які не є шкідливими для рослинних тканин. Показано, що *Pseudomonas syringae* синтезує таку кількість токсину, який, не викликає клітинний некроз.

Досить різноманітною є мікробіота філосфери зернових культур, зокрема пшениці, котра включає в себе представників майже всіх таксономічних груп мікроорганізмів. Але найбільш численну групу складають бактерії [73].

В останні роки дослідниками все більше вивчається ендоефітна мікрофлора, яка локалізована всередині тканин різних органів сільськогосподарських культур і не

викликає явних ознак інфекційного процесу [74]. Встановлено, що кількість окремих ендосферитів у природних умовах коливається в межах 10^5 - 10^7 КУО у корені та 10^3 - 10^4 КУО у надземній частині на 1 г сирової речовини. Бактеріальні ендосферити умовно розділяють на дві групи залежно від їх належності від рослини-господаря: облигатні та факультативні. Ріст, виживання та розвиток облигатних ендосферитів повністю залежать від рослини-господаря. Факультативні ендосферити можуть існувати поза рослинами-господарями. Бактеріальні фітопатогени, облигатні або ж факультативні, можуть перебувати також у складі ендосферитної мікробіоти – такі мікроорганізми часто виявляються в авірулентній формі в ендосфері рослин. Основним механізмом проникнення ендосферитної мікробіоти у тканини рослин є здатність до продукції ферментів, що руйнують пектин. Виробництво таких ферментів, дає можливість ендосферитам проникати в тканини рослини, не завдаючи шкоди, і колонізувати внутрішньоклітинні простори, та судинні тканини рослин-господарів (ксилема або флоема). Важливу роль у регуляції мікробної колонізації відіграють генотип рослини, стадія її росту, стан ґрунту, фізіологічний статус, а також тип рослинного органа тощо [75]. Найбільш вивченими та дослідженими є ендосферитні угруповання ризосфери рослин. Ризосферні бактеріальні спільноти розвиваються і притягуються до ризосфери завдяки наявності в їх складі багатим на вуглець поживним речовинам ризосферних ексудатів [76]. Колонізація рослин-господарів бактеріальними ендосферитами зазвичай включає пасивну інвазію в корінь у місцях появи бічних коренів або у ранах [77]. Стратегії колонізації ендосферитними мікроорганізмами рослинних тканин включають пасивні або активні механізми, які дозволяють бактеріальним ендосферитам проникнути, до прикладу, з ризоплану у більш глибокі шари [78]. Для активного проникнення у рослинні тканини ендосферити повинні бути добре забезпечені целюлозолітичними ферментами, для того щоб активно гідролізувати клітинні стінки екзодерми рослини-господаря [79]. Найважливішими колонізаційними механізмами ендосферитних бактерій є їх рухливість та здатність до хемотаксису, а також quorum sensing. Рухливість мікроорганізмів забезпечується різним ступенем їх флагеляції і має виключне значення для хемотаксису – спрямованого руху за градієнтом поживних речовин

[80]. Початкова адгезія бактеріальних ендоситів до відкритих частин поверхні кореня здійснюється за рахунок пілей IV типу. Адгезії сприяє виділення екзополісахаридів та ліпополісахаридів [81]. Після успішного проникнення та адгезії до тканин рослинного організму бактеріальні ендосити формують біоплівку. Важливе місце у формуванні і підтриманні якої займає quorum sensing [82]. Флавоноїдні сполуки рослин сприяють колонізації рослинних тканин ендоситами, регулюючи експресію низки бактеріальних генів, таких як гени, що кодуєть систему сектерії III типу, гени залучені у синтез ліпополісахаридів, гени стійкості до фітоалексинів, тощо [83].

Крім вище перерахованого у корінь, ендоситні бактерії також можуть потрапляти крізь тканини надземної частини рослини (листки, стебло, квітки та плоди). Однак, лише незначна частина бактеріальних ендоситів здатна колонізувати верхні частини пагонів, апопласт листків та репродуктивні органи (плоди, насіння), оскільки концентрація поживних речовин у цих ділянках значно більш обмежена [84, 85]. Склад ендоситних угруповань надземних частин рослин та їх механізми колонізації тільки починають інтенсивно вивчатися, тому дані літератури у вивченні цього питання дуже нечисленні [86, 87]. Методологія виділення та культивування ендоситів надземних, а особливо репродуктивних, частин рослин недостатньо стандартизована, наслідком чого є суперечливість і недостатня співставність експериментальних даних, отриманих різними дослідницькими групами [88, 89, 90].

Оскільки пшениця, разом з кукурудзою та рисом, є трьома основними зерновими культурами, вирощуваними не тільки в Україні а й у світі, з точки зору біологізації та екологізації вирощування цієї сільськогосподарської культури, а також з метою підвищення її врожайності привертають увагу симбіотичні ендоситні мікроорганізми. Зважаючи на те, що цей напрямок мікробіологічних досліджень є достатньо молодим, дані літератури з цього питання є нечисленими і розрізненими, незважаючи на їх зростаючу кількість.

Відомо, що внутрішні тканини рослини злакових культур у тому числі пшениці широко колонізовані величезним різноманіттям ендоситних бактерій, що

належать до різних родів, включаючи *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea* тощо [91, 74, 92].

Ендоефітна мікробіота пов'язана з рослиною пшениці протягом усього свого життя, від сходів насіння до розвитку плодів [93, 94]. Особливий інтерес дослідників у цьому науковому напрямку викликають ендоефітні мікроорганізми зерна пшениці. Зернівки пшениці складаються з трьох основних компартментів - зародок, аендосперму та насінневої оболонки і є одними з найважливіших органів рослини, колонізованих ендоефітною мікробіотою [95]. Їх виключна роль полягає у здатності стимулювати ранні стадії росту пшениці та інших зернових культур [93, 96, 97]. Як продемонстрували Geisen et al. [98], насінневі ендоефітні бактерії надзвичайно важливі в життєвому циклі сперматофітів, оскільки вони мають здатність зберігатися у стані спокою протягом доволі тривалого часу до проростання насіння. Здатність тривалий час перебувати у латентному стані, у тому числі й за несприятливих умов, властива лише ендоефітним мікроорганізмам зерна пшениці, та не притаманна жодним іншим ендоефітам цієї злакової культури [94]. Іншими унікальними особливостями, якими володіють насінневі ендоефіти є рухливість клітин та активність фітази, які дозволяють їм безпосередньо проникати в насіння [94].

На думку багатьох дослідницьких груп ендоефітні мікроорганізми зерна пшениці є відправною точкою для формування ендоефітних угруповань рослини, в цілому і чинять істотний вплив на схожість зерна, ріст та продуктивність рослини [99].

Якісний і кількісний склад ендоефітних мікроорганізмів залежить від сорту пшениці. Встановлено, що сортозразки пшениці від 44 до 97 % інфіковані ендоефітними мікроорганізмами [100]. Найчастіше у сортозразках пшениці (в залежності від сорту пшениці) виявляють мікроміцети – від 37 до 95 %. Серед бактерій найчастіше переважають спороутворюючі, їх загальна кількість досягає 60 % від загальної ендоефітної бактеріальної маси. Рідше виявляють жовто-пігментовані бактерії *P. agglomerans*, і зовсім – рідко бактерії таких видів як *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, та бактерії роду *Erwinia*. Мікроміцети

найчастіше переважають в тих рослинних тканинах, де зустрічається менше спорових бактерій. Це свідчить про антагоністичні відносини між ендоефітними бактеріями і мікроміцетами. Якісний склад ендоефітної мікрофлори особливо не відрізняється від епіфітної, за винятком тих фітопатогенних бактерій, які не виявлені серед ендоефітів. За фізіолого-біохімічними властивостями бактерії, які були ізольовані з поверхні рослин не відрізнялись від виділених з внутрішніх тканин пшениці. Також зустрічаються бактерії родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, та *P. agglomerans* як на поверхні, так і у внутрішніх тканинах рослин пшениці. Такі дані підтверджують результати про здатність епіфітних бактерій *P. agglomerans* проникати в тканини пшениці, що свідчить про те, що численна епіфітна мікрофлора, яка мешкає на різних сільськогосподарських рослинах може потрапляти всередину, в насіння рослини та плоди і ставати ендоефітною [101]. На поверхні здорового зерна пшениці переважають бактерії *P. agglomerans*, а у внутрішніх тканинах бактерії роду *Bacillus*. На поверхні зерна пшениці кількість *P. agglomerans* складає 80–90 %, а у внутрішніх тканинах – 26–36 % від загальної бактеріальної мікрофлори.

Більшість з ендоефітних та епіфітних бактерій виробляють широкий спектр речовин, які регулюють ріст рослин. Серед таких речовин, що виробляються різними мікробними спільнотами, бактерії виробляють фітогормони, які володіють здатністю регулювати ріст рослин, посилюючи поглинання поживних речовин та води за рахунок модифікації корневих систем [102]. Властивості бактерій, що сприяють росту рослин, можуть відрізнятися, і важливо вивчати їх властивості на мікробних спільнотах, пов'язаних з рослинами, які є економічно важливими [103]. Деякі властивості, які проявляються ендоефітами, включають синтез 1-аміноциклопропан-1-карбоксилатдеамінази (ACCD), солубілізацію фосфатів, вироблення індол-3-оцтової кислоти (IAA), сидерофорів, та антимікробних метаболітів [104]. Важливою властивістю для росту і розвитку рослин-хазяїв є здатність ендоефітних спільнот фіксувати нітроген [105]. Ендоефітні мікроорганізми відіграють важливу роль у забезпеченні доступності фосфору для рослин. Виробництво органічної кислоти мікроорганізмами, що призводить до зниження

pH середовища є основним механізмом, що бере участь у сольобілізації фосфатів [106, 107].

За даними наявної літератури, усі описані вище властивості ендofітної мікробіоти, притаманні й ендofітам зернівок пшениці. Однак, зерновим ендofітам притаманні також деякі унікальні рістстимулювальні властивості. Зокрема, деякі резидентні мікроорганізми зерна пшениці можуть сприяти процесу проростання шляхом вироблення цитокініну [94, 108].

Видовий склад ендofітної та епіфітної популяції бактерій впливає на ураження рослин фітопатогенами. Захищеність рослин від фітопатогенних бактерій залежить від наявності у складі мікробіоти рослин мікроорганізмів з антагоністичними властивостями та здатністю швидко колонізувати поверхню рослин і мати високу конкурентну спроможність. Серед сапрофітних бактерій є багато перспективних об'єктів для створення біопрепаратів, які стимулюють ріст рослин та підвищують їхню стійкість до хвороботворних агентів. Наприклад, перспективною бактеріальною групою для біологічного контролю захворювань сільськогосподарських культур та стимуляції їхнього росту є представники роду *Pseudomonas*, які колонізують широке коло одно- і дводольних рослин та утворюють стабільні асоціації з рослиною упродовж її вегетаційного періоду [109]. Добре відомий в цьому аспекті антагоністичний вплив представників роду *Bacillus* на різні види фітопатогенів [110, 111.]. Зокрема, на основі *B. thuringiensis* створено препарати для захисту рослин від хвороботворних мікроорганізмів та комах-шкідників [112].

Ендofітні мікроорганізми зерна також значною мірою сприяють не лише росту та здоров'ю рослин та засвоєнню поживних речовин, а також підвищують стресостійкість рослини в цілому та сприяють підвищенню її імунітету [8]. Описані також деякі ендofітні бактерії з антагоністичним ефектом щодо збудників хвороб зернових культур, включаючи пшеницю [113]. Серед багатьох механізмів антагонізму зернових ендofітів у літературі повідомляється про їх здатність підтримувати індуковану системну резистентність [114, 115].

Відомо також, що ендofіти мають здатність розкласти ксенобіотики та органічні сполуки, а також протистояти важким металам або антимікробним препаратам. Показано, що ендofіти забезпечують стійкість до стресу під час посухи та підвищують толерантність до несприятливих ґрунтових умов [116, 117].

Таким чином, рістстимулювальні властивості симбіотичних мікроорганізмів рослин, у т.ч. ендofітної мікробіоти, а також їх здатність підвищувати стійкість рослини до біотичних та абіотичних стресорів роблять їх перспективними кандидатами для розробки біопрепаратів для екологізації сільського господарства. При цьому слід відзначити, що корисні для рослини-хазяїна властивості ендofітів значно відрізняються залежно від виду рослини, її генетичних особливостей, природних умов її росту, а також агропромислових заходів, в умовах застосування яких росте рослина у випадку сільськогосподарських культур. Це зумовлює необхідність глибокого вивчення рістстимулювальних та антагоністичних властивостей ендofітів сільськогосподарських культур з метою їх подальшого використання у агробіотехнології. На нашу думку, одним з найбільш перспективних джерел отримання біотехнологічно значимих симбіотичних мікроорганізмів є зернові ендofіти сільськогосподарських культур, у т.ч. й пшениці, оскільки саме вони мають виключне значення для початкових етапів росту рослини, залучені у започаткування її стрес-толерантності та стрес-резистентності.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Фітопатогенні мікроорганізми та умови їх культивування.

У роботі використано два штами фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978: УКМ В-1013, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* (Elliott 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 УКМ В-1154, які підтримуються у колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ. Використані штами є вірулентними для зернових культур. *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В-1013, *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 зберігали на картопляному агарі (КА).

2.2. Отримання бактеріального ліпополісахариду

Для того щоб одержати препарати ліпополісахаридів (ЛПС) із клітин *P. syringae* бактерії вирощували на середовищі КА 24 год при температурі 28°C. Бактеріальні клітини змивали 0,85 % розчином хлориду натрію і осаджували центрифугуванням (6000 g, 15 хв). ЛПС екстрагували із бактеріальної маси двічі 0,85 % розчином NaCl за перемішування на магнітній мішалці при температурі 4° С протягом 4-5 год [118]. На кожні 10 г бактеріальних клітин використовували 100 мл розчину NaCl. Екстракти центрифугували (6000 g, 15 хв), очищували діалізом проти води упродовж 24 годин і ліофільно висушували. Ліофільно висушені ЛПС очищували ультрацентрифугуванням 4 год при 105000 g і температурі 4°С і використовували у подальших дослідках.

2.3. Сорти пшениці, використані у дослідженнях

У роботі використовували зерно озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) вітчизняної та зарубіжної селекції врожаю 2017 року сортів Хуторянка, Печерянка, Подолянка, Столична, Смуглянка, Золотоколоса, Фаворитка, Трипільська, Діскус, Хукулус, Гренні, Тацітус, Патрас, характеристика яких наведена в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристика досліджуваних сортів пшениці

Назва сорту	Вид культури	Рекомендована зона для вирощування	Країна походження	Зимостійкість	Посуhostійкість	Стійкість до хвороб
1	2	3	4	5	6	7
Печерянка	Яра, м'яка	Лісостеп	Україна	Середня	Середня	Вище середньої
Гренні	Яра, м'яка	Полісся	Німеччина	Висока	Висока	Висока
Хуторянка	Озима	Лісостеп	Україна	Середня	Середня	Вище середньої
Діскус	Озима	Лісостеп	Німеччина	Висока	Висока	Висока
Хукулус	Озима, м'яка	Лісостеп, Полісся	Франція	Відмінна	Відмінна	Висока
Тацітус	Озима, м'яка	Лісостеп	Австрія	Відмінна	Висока	Середня
Патрас	Озима, м'яка	Лісостеп, Полісся	Німеччина	Висока	Висока	Висока

1	2	3	4	5	6	7
Подільська	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Висока	Середня
Столична	Озима, м'яка	Лісостеп, Полісся	Україна	Вище середньої	Середня	Середня
Смуглянка	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Вище середньої	Висока	Висока
Золотоколоса	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Середня	Висока
Фаворитка	Озима	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Середня	Висока
Трипільська	Озима, м'яка	Степ, Лісостеп, Полісся	Україна	Висока	Висока	Висока

2.4. Схема дослідження впливу фітопатогенних бактерій та їх ліпополісахаридів на проростання зерна та ріст проростків пшениці різних сортів

Для обробки зерна пшениці застосовували живі клітини фітопатогенних бактерій та їх ЛПС. Фітопатогенні бактерії вирощували на КА за 28° С впродовж 24-48 год. Клітини бактерій змивали фізіологічним розчином та готували суспензію титром 10⁹ КУО/мл за стандартом мутності. ЛПС екстрагували, як описано у п.2.2. Для постановки дослідів використовували розчин ЛПС з концентрацією 5 мг/мл.

Зерно пшениці промивали водогінною, а потім стерильною дистильованною водою та розкладали у чашки Петрі на стерильний фільтрувальний папір по 20 зернівок. У кожному варіанті досліду використовували не менше 60 зернівок пшениці. У чашки Петрі вносили відповідно до варіанту досліду 5 мл води (контроль), 5 мл суспензії клітин або 5 мл розчину ЛПС. Облік схожості зерен проводили на другу добу пророщування у вологій камері за температури 27° С, довжину основного кореня проростків вимірювали на 4 добу.

2.5. Дослідження впливу фітопатогенних бактерій на систему антиоксидантного захисту проростків пшениці різних сортів

Для дослідження використовували 7-добові етіюльовані проростки озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сортів Подолянка, Діскус, Фаворитка. Обробку зернівок пшениці фітопатогенними бактеріями та їх ЛПС проводили, як описано у п. 2.4. Для оцінки стану системи антиоксидантного захисту проростків пшениці визначали вміст ТБК-активних продуктів та активність антиоксидантних ензимів, зокрема, супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ), у загальному білковому екстракті. Екстракцію білків з проростків здійснювали 50 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7.8) з проростків (150 мг), гомогенізованих у рідкому азоті. Отриманий гомогенат центрифугували при 12 000 г впродовж 15 хв при 4°С. Визначення вмісту білка проводили за методом Бредфорда (Bradford, 1976) [119]. Для приготування реакційної суміші використовували 0.16 мл 0.15 М NaCl, 0.04 мл екстракту (в контрольну кювету додавали 0.05 М калій-фосфатний буфер, рН 7,8), 2-3 мл реактиву Бредфорда. Вимірювання оптичної густини проводили через 15 хв при $\lambda=595$ нм. Для визначення вмісту білка використовували калібрувальну криву з використання розчинів з відомою концентрацією БСА.

2.5.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали методом Giannopolitis, Ries, 1977 [120]. Інкубаційне середовище містило 1,3 мМ рибофлавіну, 13 мМ метіоніну, 63 мкМ нітросинього тетразолію, 0,1 мМ ЕДТА та білковий екстракт. Реакцію запускали додаванням до середовища рибофлавіну. Досліджувані зразки інкубували протягом 10-15 хв на світлі. Вимірювання проводили відносно контролю, що містив 0.05 М калій-фосфатного буферу (рН 7.8) замість білкового екстракту та інкубували в темряві. Визначення активності супероксиддисмутази проводили за її здатністю інгібувати утворення формазану відносно світлового контролю. Абсорбцію світла вимірювали при $\lambda=560$ нм проти контролю, який витримували в темряві. Метод базується на здатності СОД інгібувати відновлення нітросинього тетразолію радикалами супероксиду на світлі у присутності рибофлавіну та метіоніну.

2.5.2. Визначення активності каталази

КАТ (КФ 1.11.1.6) визначали згідно методу, наведеного у роботі Аєбі, 1984 [121]. Реакційна суміш містила 2,9 мл фосфатного буфера додавали 25 мкл білкового екстракту та 90 мкл 3%-го H_2O_2 (в контрольну кювету перекис водню не додаємо). Зниження абсорбції світла вимірювали за 1 хв при 240 нм. Активність каталази виражали в мкмольх H_2O_2 /хв на 1 г сирової маси, використовуючи при цьому коефіцієнт молярного поглинання ϵ .

2.5.3. Дослідження вмісту ТБК-активних продуктів

Вміст ТБК-активних продуктів (за вмістом МДА) визначали згідно методу Kumar, Knowles, 1993 [122]. Наважку (0.2 г) рослинного матеріалу гомогенізували у ступці з 0.1 М Трис-НСІ буфером (рН 7.6). До суміші додали 2 мл 20% трихлороцтової кислоти та 1 мл 0.67% тіобарбітурової кислоти. Інкубували на

киплячій водянній бані протягом 30 хв. Реакцію зупиняли охолодженням. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, центрифугували при 3 000 об/хв протягом 10 хв. Екстинкцію вимірювали у верхньому бутаноловому шарі при $\lambda=533$ нм. Розрахунок вмісту МДА проводили з урахуванням коефіцієнту його молярної екстинкції ($155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Обрахунок проводили за формулою:

$$[\text{ТБК-активні продукти}] = (E \times V_1 \times V_2) / (\epsilon \times V \times C), \text{ де}$$

E – екстинкція дослідної проби; ϵ – молярний коефіцієнт екстинкції; V_1 – об'єм бутанолу; V_2 – об'єм проби; V – об'єм супернатанту; C – концентрація білка в супернатанті.

2.6. Визначення вмісту проліну

Вміст проліну в досліджуваних зразках визначали за методом Bates, 1973 [123]. Наважку (0.15 г) рослинного матеріалу гомогенізували у ступці з 3% сульфосаліциловою кислотою, переносили кількісно в пробірки, доводили до 2 мл. Отриманий гомогенат центрифугували 10 хв при 8000 об/хв. 1 мл супернатанту переносили в чисту пробірку. До 1 мл супернатанту додавали 1 мл розчину кислого нінгідрину та 1 мл льодяної оцтової кислоти. Пробірки закривали оберненими холодильниками, потім поміщали на киплячу водяну баню. Інкубували протягом 60 хв. Реакцію зупиняли охолодженням. Після охолодження до пробірок додавали 3 мл бензолу, перемішували та залишали при кімнатній температурі протягом 30 хв до розділення двох фаз. Вимірювали оптичну густину розчинів (бензолова фракція) при $\lambda=520$ нм проти контролю, в який замість екстракту додавали буфер. Розрахунок вмісту проліну проводили за калібрувальною кривою.

2.7. Виділення та характеристика ендоефітних мікроорганізмів з пшениці

Ендоефітні мікроорганізми з зерна пшениці стійких, помірно стійких та чутливих до дії *P.syringae* pv. *atrofaciens* сортів виділяли згідно методу Herrera et al. 2013 [124]. Для цього зернівки трьох сортів пшениці промивали 15 хв проточною водогінною водою, поверхнево дезінфікували шляхом послідовної обробки 70% етанолом (30 с), далі 2% Cl₂ (4хв) і знову 70% етанолом (30 с), промивали 6 разів по 15 хв у стерильній дистильованій воді на струшувачі ААБ-ПУ-01 при 2000 об/хв. Для перевірки ефективності стерилізації поверхні насіння 1 мл останньої промивної води висівали на середовище R2A+ ністатин 50 ОД/мл. Через 7 днів інкубації при 28 ° С, якщо на середовищі не було виявлено мікробного росту, це вказувало на успішну стерилізацію поверхні, а саме знищення або пригнічення росту епіфітних бактерій. Таким чином, мікробні ізоляти вважалися справжніми ендоефітами. Для підрахунку КУО бактеріального ендоефіту поверхнево стерилізоване (як описано вище) зерно пшениці (1 г) переносили у стерильну фарфорову ступку з 9 мл 10 мМ фосфатного буфера (рН 6,5) і гомогенізували за допомогою стерильного товкача. 1 мл суспензії переносили в 9 мл 10 мМ фосфатного буфера. Здійснювали послідовне розведення і кожне розведення висівали у трьох повторах на КА для підрахунку загальної кількості бактерій. Агар Макконкі (HiMedia, Індія) використовували для ідентифікації грамнегативних бактерій, агар МҮР (HiMedia, Індія) - для бацил. Чашки Петрі інкубували при 24 ° С і регулярно досліджували на предмет видимого росту бактерій.

Далі десять поверхнево стерилізованих насінин розкладали на чашки Петрі, що містили поживне середовище R2A (п'ять повторів). Потім усі чашки Петрі інкубували при 28 °С протягом 72 годин. Термін інкубації був обмежений інтенсивним ростом ендоефітних грибів із зерен деяких сортів пшениці. Після чого були відібрані схожі колонії, що проростали на більшості чашок Петрі, та згруповані відповідно до їх морфологічних характеристик, включаючи край, форму, колір, в'язкість, висоту тощо, щоб вибрати однотипні колонії. Після

повторних досліджень з кожного сорту пшениці було отримано кілька ізолятів. Потім ці ізоляти характеризували за допомогою стандартних протоколів, заснованих на морфології, фарбуванні за Грамом, дослідженні спор. Крім того, усі виділені бактеріальні ізоляти пройшли скринінг на антагоністичну активність щодо *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, який був виділений з уражених рослин і зберігався в колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім Д.К. Заболотного НАН України і використовувався для аналізу *in vitro* антагоністичної активності ендofітних бактерій.

2.8. Визначення антагоністичної активності ендofітних мікроорганізмів пшениці щодо *P. syringae*

На поживний агар *R2A* (протеозний пептон: 0,5 г, дріжджовий екстракт: 0,5 г, глюкоза: 0,5 г, гідролізат казеїну: 0,5 г, розчинний крохмаль: 0,5 г, піруват натрію: 0,3 г, калій фосфорнокислий двозаміщений: 0,3 г, сульфат магнію: 0,024 г, агар-агар: 15 г рН: 7.2), висівали суспензію добової культури *P. syringae* pv. *atrofaciens*, вирощеної на КА, з концентрацією клітин 1мл/МФ. Антагоністичну активність бактерій визначили методом дифузії з агарових лунок, як описано Agarwal et al., 2020 [125], з незначними змінами. В агаризованому поживному середовищі з висіяною газоном *P. syringae* pv. *atrofaciens*, робили лунки діаметром 1 см, до яких додавали 60 мкл суспензії клітин кожного ендofітного ізоляту в концентрації 10^9 КУО/мл та інкубували при 28°C протягом 24 год. Як негативний контроль використовували стерильну дистильовану воду. Антагоністичну активність оцінювали на основі утворення зони затримки росту навколо лунки.

2.9. Ідентифікація ендofітних мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо *P.syringae*

Для ідентифікації ендofітних мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо *P. syringae* pv. *atropaciens* застосовували метод біохімічної ідентифікації з використанням мікробіологічного аналізатора, ідентифікацію на основі MALDI-TOFF спектра та за результатами секвенування фрагмента гена 16S рРНК. Додаткову верифікацію проводили з використанням індикаторних біохімічних тестів.

2.9.1. Біохімічна ідентифікація ендofітних мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо *P.syringae*

Біохімічне профілювання ізолятів проводили за допомогою VITEK® 2Compact (bioMérieux SA, Франція) відповідно до рекомендацій виробника тест-системи. Для досліджень використовували чисті бактеріальні культури, культивовані 18-24 год. на відповідних поживних середовищах (bioMérieux, Франція). Суспензію бактерій з концентрацією 1,8 - 2,2 McFarland у фізіологічному розчині VITEK (bioMérieux SA, Франція) готували з використанням денситометра DensiCHECK PLUS (bioMérieux SA, Франція). Аналіз проводили за допомогою ідентифікаційних карт BCL. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення VITEK 2C версії 08.01 відповідно до інструкцій виробника [bioMérieux (2015, 19 квітня). Отримано з <http://www.biomerieux.pl/>].

2.9.2. Дослідження MALDI-TOF спектру ендofітних мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо *P. syringae*

Для досліджень використовували чисті бактеріальні культури, вирощені 18-24 год. на відповідних поживних середовищах (bioMérieux, Франція). Не більше, ніж половину мікробіологічної петлі діаметром 1 мм, виділеного

мікроорганізму наносили в одну або дві дослідні лунки на цільовому слайді (мішені) VITEK MS-DS (bioMérieux SA, Франція), таким чином, щоб рівномірно розподілити культуру по всій лунці. Одразу після нанесення культури, у лунку додавали 1 мкл реактиву VITEK MS-CHCA (bioMérieux SA, Франція). Після повного висихання усіх лунок мішені, що підтверджує поява на їх поверхні дрібних жовтих кристалів, мішень встановлювали в апарат. Зразок піддавали обробці серією лазерних імпульсів всередині пристрою. Матрикс поглинає лазерне випромінювання та випаровується разом із досліджуваним зразком; у ході даного процесу відбувається іонізація часточок, що піддалися випаровуванню. Після цього електричні поля направляють іони у вакуумну трубку, де відбувається їх розділення відповідно до маси (чим вища швидкість, тим менша маса іонів). Отримані результати відображаються системою на графіку у вигляді ряду ліній та піків – спектра, який відповідає різним молекулам, що відділилися від зразка. Спектри досліджуваних зразків порівнювалися системою з базою даних спектрів виробника програмного забезпечення. У разі, якщо спектр досліджуваного зразка співпадає з одним із спектрів бази даних, система ідентифікує зразок. Діапазон процентних ймовірностей для правильної ідентифікації становить від 60 до 99 із значеннями ближчими до 99,9, що вказує на більш точну відповідність. [126, 127]

2.9.3. Секвенування фрагмента гена 16S рРНК

Підготовка бактеріальних клітин. Культури мікроорганізмів вирощували на скошеній поверхні середовища МПА протягом доби. Отримували змиви клітин у стерильному фізіологічному розчині, осаджували центрифугуванням за 10 000 об/хв протягом 10 хв. Отриманий осад використовували для виділення ДНК.

Виділення ДНК. ДНК виділяли із використанням комерційного набору Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, США) згідно із інструкцією виробника: клітини лізували у лізуючому буфері та переносили на спін-колонки. Після двократного відмивання промиваючим буфером (washing buffer), елюювали ДНК відповідним розчином для елюції. Виділену геномну ДНК та ампліфіковану

ДНК візуалізували методом електрофорезу в агарозному гелі (1%) з додаванням етидію броміду.

ПЛР. Для ампліфікації було обрано прямий праймер: 27F-5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' та зворотній праймер 803R-5'-CTACCRGGGTATCTAATCC-3' (Eurofins Genomics). Використання даної пари праймерів дозволяє отримати амплікон біля 800 п.н., що містить варіабельні ділянки V1, V2, V3 та V4 [128]. Використовували комерційний набір One Taq 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, Велика Британія), що містив у кінцевій концентрації (x1) 20 mM Tris-HCl (pH 8.9), 22 mM NH₄Cl, 22 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dTTP, 5 % гліцеролу, 0.06 % IGEPAL® CA-630, 0.05 % Tween® 20, 25 одиниць/мл фермента OneTaq® DNA Polymerase. Реакційна суміш для ПЛР містила праймери у кінцевій концентрації 0,2 мкМ кожного та бактерільну ДНК (1 нг-1 мкг). Ампліфікацію здійснювали з використанням приладу Eppendorf 5333 MasterCycler Thermal Cycler за умов: первинна денатурація при 94°C протягом 30 сек; 30 циклів: денатурація при 94°C (30 сек), відпал праймерів при 60°C (20 сек), елонгація при 68°C (1 хв); фінальна елонгація при 68°C (5 хв).

Очищення ампліфікованої ДНК. Отриманий амплікон очищували від компонентів реакційної суміші, матричної ДНК та праймерів за допомогою комерційного набору Zymo Research (DNA Clean & Concentrator™-5, США). Після дворазового відмивання промиваючим буфером на спін-колонці, елюювали ДНК відповідним розчином для елюції та отримували кінцевий об'єм 8-10 мкл ДНК. До очищеної ампліфікованої ДНК додавали прямий праймер та відправляли на секвенування.

Секвенування. Зразки ДНК секвенували у лабораторії Eurofins Genomics (Кьольн, Німеччина) методом дидезоксинуклеотидів (Сенгера). Отримані послідовності використовували для подальшого аналізу.

Аналіз послідовностей ДНК.

Отримані послідовності порівнювали за допомогою BlastN з такими, завантаженими у GenBank, що віднесені до переліку типових штамів або ж

належним чином опублікованими послідовностями. Множинне вирівнювання послідовностей виконували за допомогою філогенетичного інструменту Muscle, коригування розмірів вирівнюваних послідовностей виконували за допомогою алгоритму Gblocks, побудову філогенетичного дерева здійснювали методом найбільшої правдоподібності (Maximum Likelihood) за допомогою інструменту PhyML в рамках онлайн-сервісу <http://www.phylogeny.fr/>. Для візуалізації топології дерева використовували програму Mega7.

2.9.4.Тест на індол

Тестування проводили з використанням тест-системи «ІНДОЛ-тест» (ERBA MANNHEIM, Німеччина). Індол є одним з продуктів розщеплення триптофану в процесі метаболізму бактерій. У середовищах, що містять триптофан в достатній кількості, індол можна виявити за його здатністю взаємодіяти з деякими альдегідами з утворенням забарвленої сполуки. Відбувається гідроліз триптофану з утворенням індолу, піровиноградної кислоти та аміаку. Утворений індол реагує з парадиметиламіноцінмальдегідом з утворенням похідної сполуки синьо-зеленого кольору. Для постановки тесту використовували добові культури мікроорганізмів, вирощені на агаризованому середовищі, що містить триптофан. Необхідна кількість триптофану у середовищі досягалася додаванням 7 г/л триптоні. На смужки фільтрувального паперу, просоченого індикаторним реагентом, наносили стерильним аплікатором ізольовану колонію досліджуваного мікроорганізму, рівномірно розподіляючи інокулят по фільтрувальному паперу і спостерігали за зміною кольору. При позитивному результаті на папері протягом 2-5 хв з'являлося яскраве синьо-зелене забарвлення. При негативній реакції папір набував рожевого кольору.

2.9.5. Тест на оксидазу

Для проведення досліджень використовували OXItest REF MLT00039 (ERBA MANNHEIM, Німеччина) згідно вимог виробника. Тест ґрунтується на здатності певних видів бактерій виробляти цитохромоксидазу або індофенооксидазу, які каталізують перенесення електронів від донорів водню (НАДН) до акцепторів (зазвичай кисню). В оксидазному тесті безбарвний *n*-фенілендіамін дигідрохлорид, який використовується як штучний акцептор електронів, за участю оксидази окиснюється з утворенням похідної сполуки, що має синє забарвлення. Комерційні тести являють собою насичені реагентом смужки. Стерильним аплікатором брали досліджувану колонію і розподіляли її по смужці. При позитивній реакції через 10-30 сек. з'являвся інтенсивно синій або фіолетовий колір. При негативній реакції колір не змінювався. При невизначеному результаті, коли забарвлення з'являлося пізніше 30 сек., дослідження необхідно було повторити тестування зі свіжою культурою (18-24-годин).

2.10. Статистичний аналіз даних

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами. Для визначення вірогідності відмінності між порівнюваними варіантами дослідження у випадку парних порівнянь (зразки, оброблені патогеном і необроблений контроль) використовували *t*-критерій Стьюдента. Для множинного порівняння показників трьох варіантів дослідження застосовували дисперсійний аналіз Anova з поправкою Бонфероні для контролю ймовірності групової помилки та мінімізації похибки методу. Статистично достовірними вважали відмінності між показниками при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вплив фітопатогенних псевдомонад на проростання зерна та ріст проростків озимої пшениці різних сортів

Захист рослин, у тому числі й сільськогосподарських культур, проти абіотичних стресів, таких як посуха, приморозки, високі температури, ультрафіолетове випромінювання, засолення ґрунтів тощо, та фітопатогенів забезпечується двома детермінантами: резистентністю (здатністю рослини-господаря обмежувати розмноження патогенів) і толерантністю (здатністю рослини-господаря зменшувати шкодочинний вплив абіотичного чинника та/або інфекції, незалежно від рівня розмноження патогену шляхом розвитку толерантності) [130]. Значна роль у розвитку як стійкості, так і толерантності рослини до біотичних стресорів, таких як фітопатогенні бактерії, належить її симбіотичним мікроорганізмам [131]. На першому етапі дисертаційного дослідження вивчали стійкість до фітопатогенних псевдомонад у різних сортів пшениці вітчизняної і зарубіжної селекції, що широко використовуються в агропромисловому комплексі України, з метою виявлення сортів з різним ступенем резистентності до фітопатогенних бактерій і подальшого порівняльного дослідження ендofітних зернових угруповань обраних сортів.

3.1.1. Вплив збудника базального бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 на схожість зерна і ріст проростків пшениці різних сортів

Заражене насіння пшениці є одним із ключових джерел колонізації рослини збудником базального бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Проблема взаємного впливу мікро- та макроорганізмів все більше привертає увагу

дослідників. Розуміння механізмів взаємодії про- та еукаріотів необхідне для розроблення підходів до попередження та лікування бактеріальних захворювань. Останнім часом особливу увагу у цих процесах дослідники звертають на роль окремих структурних компонентів клітин бактерій та їхніх метаболітів (зокрема ЛПС). Першим завданням цього етапу дослідження було вивчити, як впливають живі клітини широко розповсюдженого адаптованого патогену пшениці та його ЛПС, на схожість насіння пшениці та ріст проростків. Планування цих експериментів проводилося з урахуванням результатів досліджень, що були проведені раніше у відділі фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ [131]. Щоб прослідкувати вплив адаптованого патогену та його ЛПС на схожість зерна і ріст проростків нами було використано зерна озимої (11 сортів) та ярої (2 сорти) пшениці української (9 сортів) та закордонної селекції (див. Табл. 2.1 у розділі матеріалів і методів). Усі використанні в роботі сорти внесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні [133]. ЛПС адаптованого патогену, який було отримано нами для дослідження, мав хімічний склад, подібний до раніше досліджених ЛПС цього виду бактерій, і містив 30% вуглеводів, 28% білків, 5% нуклеїнових кислот та 2-кето-3-дезоксиктонову кислоту [134]. Частина досліджуваних сортів як озимої, так і ярої пшениці виявилися чутливими як до самого збудника базального бактеріозу, так і до його ЛПС. Живі клітини адаптованого збудника не впливали на схожість зерна для таких сортів пшениці, як Подолянка, Столична і Золотоколоса (рис.3.1), на відміну від інших 9 сортів. Незначно знижувалася схожість сортів пшениці Діскус та Тацитус. Низьку схожість зерна відмічали у сортів Печерянка, Хуторянка, Патрас, Хукулус, Гренні, Фаворитка. Найбільшою мірою зменшувалась схожість зерна сортів Смуглянка та Трипільська (рис.3.2). Для усіх сортів пшениці, оброблених розчином ЛПС адаптованого патогену, відмічалось зниження схожості насіння, окрім зерна сорту Столична, схожість якого не зменшувалася як за обробки живими клітинами, так і після обробки розчином ЛПС (рис. 3.1.) Вплив ЛПС адаптованого патогену на

схожість зерна був інтенсивнішим, аніж вплив живих клітин збудника у більшості випадків.

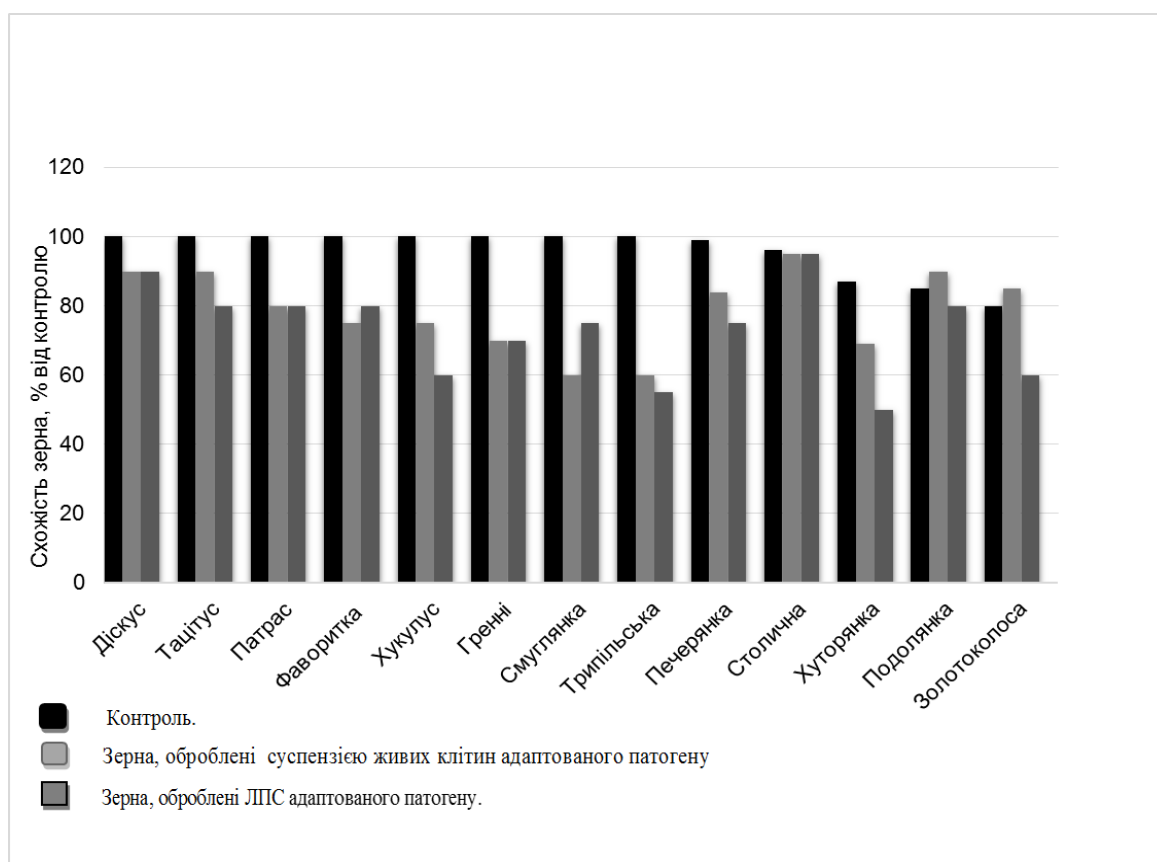


Рис.3.1. Вплив оброблення суспензією живих клітин і ЛПС *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013 на схожість зерна пшениці

Як видно з таблиці 3.1. та рисунка 3.2., для усіх 12 досліджених сортів спостерігалось пригнічення росту паростків за оброблення зерен суспензією живих клітин та розчином ЛПС адаптованого патогену, лише для пшениці сорту Столична було виявлено достовірну стимулювальну дію ЛПС. Стимулювальний вплив ЛПС фітопатогенних бактерій на ріст рослин описано й іншими авторами [135], що може пояснюватися формуванням толерантності за рахунок механізмів адаптації.

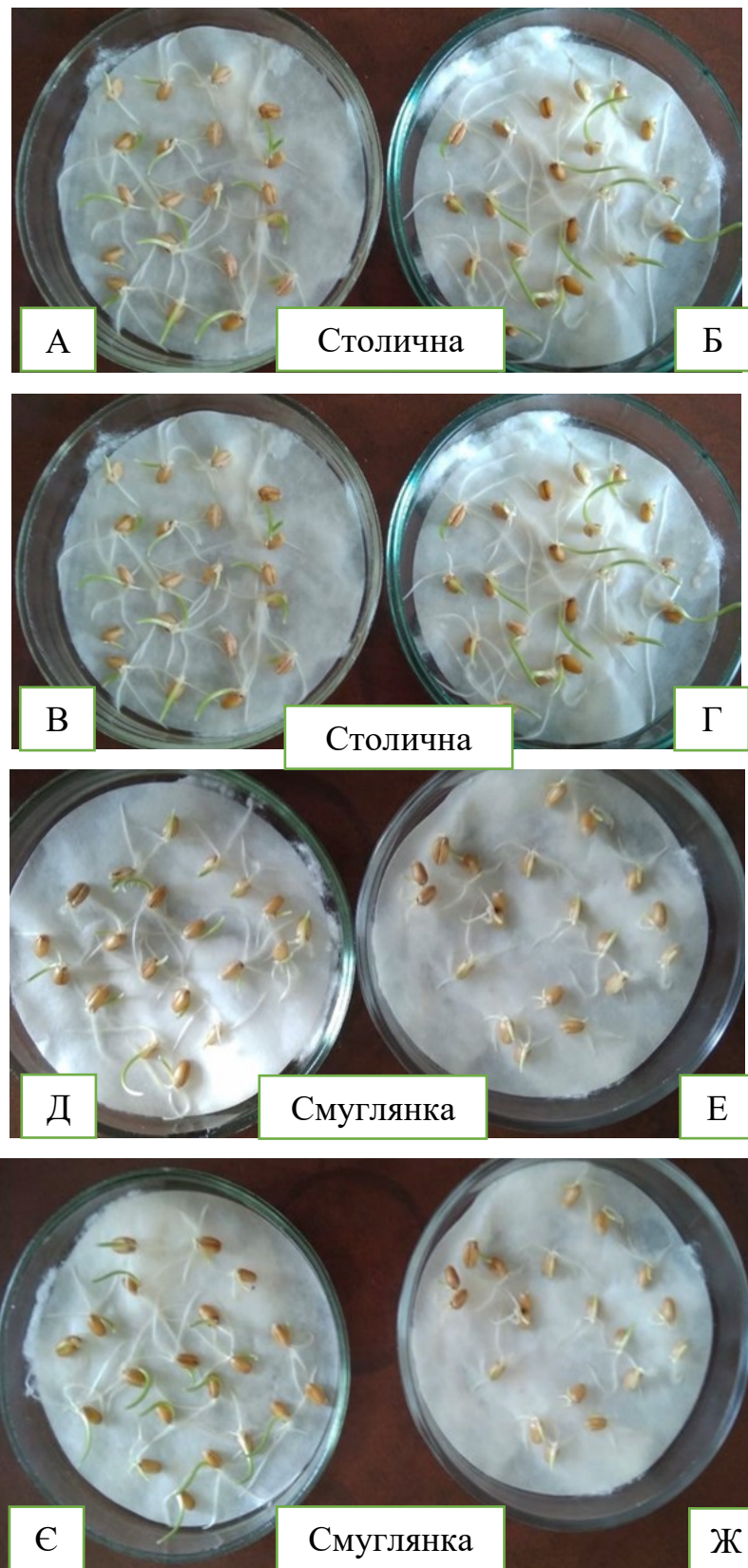


Рис.3.2. Репрезентативні ілюстрації впливу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* та його ліпополісахариду на проростання зерна та ріст паростків пшениці. А, В, Д, Є – контроль; Б, Е – обробка живими клітинами; Г і Ж – обробка ЛПС.

Ріст проростків пшениці у сортів Смуглянка і Фаворитка найбільшою мірою зазнавав негативного впливу ЛПС адаптованого патогену: довжина кореня проростків була меншою порівняно з необробленим контролем на 11 та 25% відповідно (рис. 3.2.Є та Ж).

Таблиця 3.1.

Вплив живих клітин та ліпополісахариду адаптованого патогену на ріст кореня проростків пшениці

Сорт пшениці	ЛПС		Клітинна суспензія		Контроль, мм
	Довжина, мм	% від контролю	Довжина, мм	% від контролю	
Діскус	2,6±0,51*	64	1,9±0,2*	48	4,0±0,4
Тацітус	1,6±0,4*	72	1,2±0,3*	54	2,2±0,2
Патрас	1,7±0,2*	68	1,5±0,3*	60	2,5±0,3
Фаворитка	0,9±0,4*	33	0,7±0,3*	25	2,8±0,6
Хукулус	2,7±0,6*	75	2,0±0,6	56	3,6±0,5
Гренні	2,7±0,1*	71	1,6±0,3*	43	3,7±0,4
Смуглянка	0,5±0,1*	26	0,2±0,1*	11	1,8±0,6
Трипільська	1,3±0,1*	65	1,4±0,1	70	2,0±0,5
Печерянка	2,7±0,1*	75	2,3±0,8*	64	3,6±0,2
Столична	1,5±0,5	136	1,3±0,3	113	1,1±0,1
Хуторянка	2,5±0,3*	61	2,7±0,7*	62	4,5±0,5
Подолянка	1,9±0,2	83	1,7±0,3	74	2,3±0,2
Золотоколоса	2,4±0,3	104	1,8±0,3	79	2,3±0,5

* - $p < 0,05$, порівняно з контролем.

Ріст проростків усіх інших сортів менш виразно гальмувався збудником базального бактеріозу. Для всіх сортів оброблення розчином ЛПС мало менший вплив на ріст проростків ніж оброблення живими клітинами збудника. Проростки озимої і ярої пшениці майже однаково реагували на збудника. Таким чином, за

результатами дослідження впливу адаптованого патогену на схожість зерна та ріст проростків пшениці досліджені нами сорти були поділені на 3 групи. Смуглянка, Фаворитка і Трипільська виявилися найбільш чутливими до збудника. Столична - сорт озимої пшениці української селекції - виявився найбільш стійким. Достатньо високу стійкість до адаптованої фітопатогенної псевдомонади продемонстрував сорт Діскус. Найменшою стійкістю характеризувалися сорти Фаворитка та Смуглянка. Усі інші сорти характеризуються помірною чутливістю до адаптованого патогену. Цікавим є той факт, що сорт пшениці Столична характеризується середньою стійкістю до збудників грибних хвороб, а сорти Смуглянка, Фаворитка, Трипільська, а також Хукулус і Гренні - високою толерантністю [136]. Це свідчить про те, що стійкість до бактеріальних і грибних патогенів обумовлена різними детермінантами. ЛПС, виділений з адаптованого патогену, чинить виразну токсичну дію на зернівки пшениці чутливі до клітин, з яких виділено цей ЛПС. З точки зору агробіотехнології заслуговує на увагу той факт, що обробка зерна цим ЛПС стійкого сорту Столична стимулювала ріст проростків.

3.1.2. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* на схожість зерна і ріст проростків пшениці різних сортів

На наступному етапі дослідження проводили вивчення впливу неадаптованого патогену на проростання зерна та ріст паростків сортів пшениці з різною чутливістю до адаптованого для пшениці патогену. З цією метою у дослідженнях використовували патовар *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154. За фізіологічними, біохімічними, серологічними і патогенними властивостями досліджувані штами адаптованого та неадаптованого патогенів не відрізняються, це може свідчити про умовний їхній поділ на патовари. Відрізняються між собою штами лише за спеціалізацією до рослини-хазяїна. *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013- виділений з уражених бактеріозом рослин жита; *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154- виділений з уражених рослин вівса [137].

P. syringae pv. *coronafaciens* є значно менш дослідженим збудником бактеріозів зернових культур, який в останні роки привертає значну увагу фахівців у галузі сільськогосподарської мікробіології. Згідно даних літератури, існує пропозиція класифікувати його, як новий вид фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* - *Pseudomonas coronafaciens* [138]. Спектр рослин-хазяїв цього мікроорганізму лише перебуває на стадії вивчення. Зважаючи на це ми вважали за можливе розглядати його як неадаптований до пшениці патоген, що давало нам можливість провести порівняльну оцінку чутливості зернівок до патогенів з різним рівнем спеціалізації: host vs non-host resistance [139].

Для дослідження використовували 3 різні інтродуковані в Україні сорти зарубіжної селекції Діскус, Хукулус, Гренні. Сорти пшениці, які були використані у дослідженнях цієї частини роботи, характеризуються підвищеною стійкістю до основних хвороб грибної етіології, таких як бура роса, борошниста іржа, базальний та чорний бактеріози зимостійкістю і високою посухостійкістю понад 9 балів. За результатами досліджень попереднього етапу нашого дослідження сорт Діскус слід вважати стійким до дії адаптованого патогену *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013, інші два сорти характеризувалися помірною стійкістю (табл.3.1).

Оскільки ліпополісахариди (ЛПС) - основні компоненти зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій - відіграють важливу роль у взаємовідносинах бактеріальної клітини з рослиною-хазяїном, а також із навколишнім середовищем важливо було дослідити також і їхній вплив на схожість зерна пшениці, та довжину проростків [140]. Обробка зерна всіх трьох сортів пшениці суспензією живих клітин неадаптованого патовару *P. syringae* призводила до зниження їх схожості та пригнічення росту проростків. ЛПС *P. syringae* pv. *coronafaciens* виявляли фітотоксичну активність, хоча спричинювали менш значне зниження схожості зерна пшениці, ніж живі клітини цього патовару.

Характер фітопатогенної дії живих клітин та ЛПС неадаптованого патовару дещо відрізнявся від такого для адаптованого патогену (табл. 3.2.). Суспензія живих клітин неадаптованого патогену більшою мірою гальмувала схожість зерна сорту Діскус, ніж суспензія клітин адаптованого патовару, але меншою мірою

гальмувала ріст основного кореня проростків. ЛПС неадаптованого патовару чинив більш виразну гальмівну дію на проростання зернівок сорту Діскус, ніж ендотоксин адаптованого патовару. Аналогічну картину спостерігали і при обробці зерна сорту Хукулус: більш високу гальмівну дію на проростання зерна живих клітин та ЛПС – на ріст кореня проростків, порівняно з дією адаптованого патовару. Чутливість зерна сорту Гренні до *P. syringae* pv. *coronafaciens* практично не відрізнялася від такої до *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Таблиця 3.2.

Вплив адаптованого та неадаптованого фітопатогенів і їх ЛПС на схожість зерна і ріст проростків пшениці

Показник	Варіанти дослідів				
	Живі клітини <i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154 (5 мг/мл)	Живі клітини <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1013	ЛПС <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1013 (5 мг/мл)	Контроль
	1	2	3	4	5
сорт Діскус					
Схожість зерна, %	65	50	76	60	100
Довжина основного кореня проростків, мм	3,4±0,42	2,1±0,61*	1,9±0,2*	2,6±0,51*	4,0±0,4
Довжина основного кореня (% від контролю)	95	58	48	64	100

сорт Хукулус					
Схожість зерна, %	65	50	76	60	100
Довжина основного кореня проростків, мм	3,4±0,42	2,1±0,61*	2,0±0,56*	2,7±0,56*	3,6±0,46*
Довжина основного кореня (% від контролю)	95	58	56	75	100
сорт Гренні					
Схожість зерна, %	50	90	70	70	100
Довжина основного кореня проростків, мм	1,7±0,47*	2,6±0,61	1,6±0,32*	2,7±1,06	3,7±0,35
Довжина основного кореня (% від контролю)	46	70	43	71	100

Примітка: $p \leq 0,05$ відносно контролю

Таким чином, стійкість зерна пшениці до живих клітин та ЛПС адаптованого та неадаптованого патогенів не є абсолютно ідентичною і за деякими характеристиками відрізняється, що може вказувати на відмінності у механізмах резистентності. З огляду на це, завданнями наступних етапів роботи було дослідити біохімічні та мікробіологічні механізми стійкості зерна пшениці до адаптованого та неадаптованого патогенів *P. syringae*.

3.2. Вплив *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* та їх ЛПС на стан системи антиоксидантного захисту проростків пшениці різних сортів

Пригнічення ростових процесів проростків пшениці на ранніх етапах онтогенезу за впливу фітопатогенів та їх ЛПС може обумовлюватися фітотоксичною та генотоксичною дією псевдомонад. Зокрема, ЛПС *P. syringae* можуть провокувати кластогенний ефект та сприяти зниженню мітотичної активності меристематичних клітин [141]. Ушкодження хромосом може зумовлюватись розвитком окиснювального стресу внаслідок надмірної генерації активних форм кисню (АФК). Утворення АФК у клітинах рослин є неспецифічною реакцією на вплив біотичних та абіотичних факторів [142], а ефективна регуляція окиснювальних процесів необхідна для підтримки гомеостазу рослинного організму. Основними ензимами, що відповідають за знешкодження АФК, є супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза (КАТ) [143]. Окрім того, важливу роль у захисті біомолекул від окиснення відіграють низькомолекулярні сполуки з антиоксидантними властивостями. Зокрема, пролін, завдяки своїй будові та здатності утворювати стійкий радикал на третинному атомі вуглецю може безпосередньо взаємодіяти з АФК та знешкоджувати їх [144]. Надмірне утворення АФК може призводити до пошкодження клітинних мембран з утворенням продуктів перекисного окиснення ліпідів, що є надійним маркером для оцінки ступеню окиснювального стресу. У зв'язку з вище зазначеним наступний етап дисертаційного дослідження передбачав оцінку впливу обробки зернівок фітопатогенними бактеріями *P. syringae* різних патоварів (*P. syringae* pv. *atrofaciens* – адаптований патовар та *P. syringae* pv. *coronafaciens* – неадаптований патовар) та їхніми ЛПС на стан системи антиоксидантного захисту проростків пшениці. Дослідження проводили з використанням 7-добових етіюльованих проростків озимої пшениці різних за стійкістю до *P. syringae* сортів Подолянка, Дискус та Фаворитка, які були обрані на попередньому етапі дослідження.

Індукований дією фітопатогенів окиснювальний стрес у рослин оцінювали за вмістом реакційноздатних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТВК-активних

сполук). Ступінь накопичення вмісту ТБК-активних сполук у проростках пшениці, які проросли із зерна, обробленого адаптованим патогеном, відносно контрольного варіанту узгоджувався з чутливістю сортів до впливу фітопатогену. Зокрема, статистично значуще збільшення вмісту ТБК-активних сполук за умов обробки живими клітинами фітопатогенних бактерій зареєстровано у проростках сорту Фаворитка, який є найменш стійким до фітопатогенних бактерій. Так, концентрація ТБК-активних сполук, у середньому, в 1,7 рази була вищою ніж у контрольних зразках. Варто зазначити, що у сорту Фаворитка обробка живими клітинами викликала виразніше посилення рівня ТБК-активних сполук, ніж обробка ЛПС. Водночас, у проростках сорту Дискус за обробки фітопатогенними бактеріями адаптованого та неадаптованого патоварів спостерігали збільшення вмісту ТБК-активних продуктів на 40% [145]. Обробка ЛПС, отриманих із *P. syringae* pv. *atropaciens*, зумовлювала зростання цього параметру, тоді як за впливу ЛПС *P. syringae* pv. *coronafaciens* достовірної різниці не виявлено. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями щодо характеру паразитизму фітопатогенних псевдомонад. *Pseudomonas syringae* найчастіше характеризується як гемібіотрофний патоген. АФК сприяють поширенню такого патогену, викликаючи некротичну загибель клітин і прискорення розвитку симптомокомплексу в ураженій рослині [146, 147]. Найменший прояв оксидативного стресу зареєстровано у сорту пшениці з мінімальною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад (Подольняк): статистично вірогідна різниця між концентрацією ТБК-активних сполук у дослідних і контрольних зразках рослинного матеріалу була відсутня (рис.3.3).

Слід зазначити, що вміст ТБК-активних сполук у необроблених проростках сорту Фаворитка був нижчим, ніж у стійких сортах Подольняк та Дискус. Відсутність змін вмісту ТБК-активних сполук у сортів Дискус та Подольняк за впливу адаптованого патогену може свідчити про ефективну регуляцію системи антиоксидантного захисту цих сортів або їх конститутивну стійкість. Першою ланкою антиоксидантного захисту є СОД, що знешкоджує супероксид-аніон радикали (O_2^-) з утворенням пероксиду водню (H_2O_2) [148].

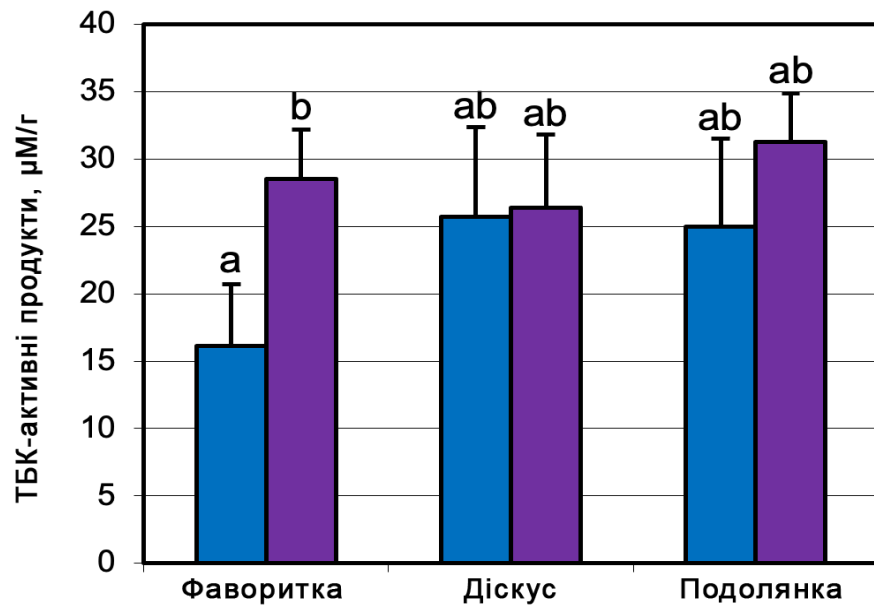


Рис.3.3. Перекисне окиснення ліпідів у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами. 1154 - *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В- 1154; 1013 - *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013; різні літери вказують на статистично вірогідні відмінності між сортами (ANOVA, тест Тьюки з поправкою Бонферроні, $P \leq 0,05$), за винятком вимірювань після впливу фітопатогену (фіолетові стовпчики), які порівнювали з їх необробленими аналогами окремо за допомогою t-критерію Ст'юдента, $P \leq 0,05$ порівняно з відповідним необробленим контролем.

СОД захищає клітини і тканини рослин від окисних пошкоджень, дії несприятливих факторів зовнішнього середовища. Показано, що у проростках сорту Фаворитка статистично вірогідне підвищення активності СОД зареєстровано лише у відповідь на обробку живими клітинами адаптованого патогена (рис.3.4).

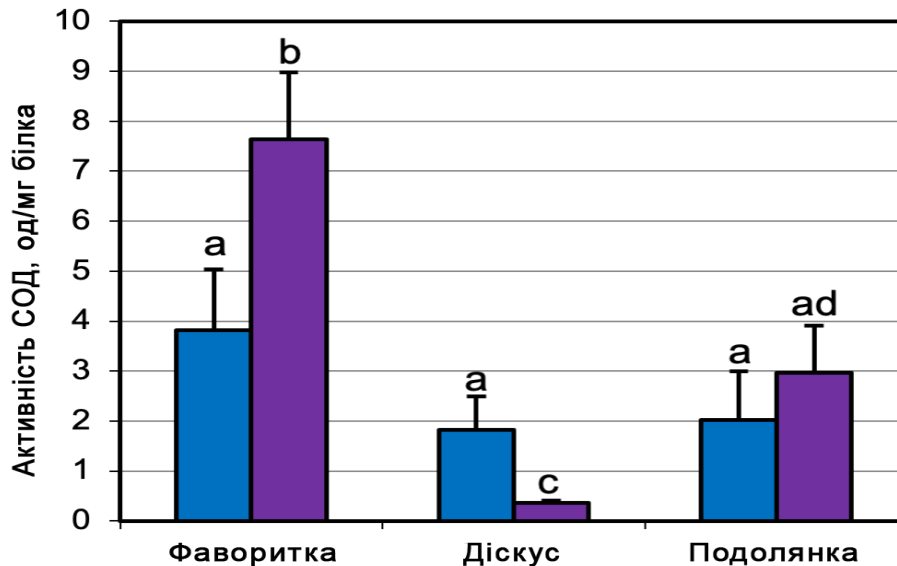


Рис. 3.4. Активність супероксиддисмутази у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами. *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 1154; 1013 - *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978: УКМ 1013; різні літери вказують на статистично вірогідні відмінності між сортами (ANOVA, тест Тьюки з поправкою Бонферроні, $P \leq 0,05$), за винятком вимірювань після впливу фітопатогену (фіолетові стовпчики), які порівнювали з їх необробленими аналогами окремо за допомогою t-критерію Ст'юдента, $P \leq 0,05$ порівняно з відповідним необробленим контролем.

У сорту Діскус спостерігали підвищення активності СОД за обробки живими клітинами обох патоварів, тоді як вплив живих клітин штаму УКМ В- 1013 обумовлював пригнічення активності цього ферменту у 5 разів. У тканинах проростків сорту Подольянка змін активності СОД за обробки клітинами обох патоварів та їх ЛПС не виявлено.

Наступною ланкою антиоксидантного захисту, що бере участь у знешкодженні пероксиду водню, є КАТ – ензим, що знешкоджує пероксид водню без допомоги відновлюючого субстрату. КАТ, як і СОД, належить до найпотужніших чинників знешкодження АФК у клітині. Узгоджена діяльність цих ензимів дає можливість підтримувати стабільний рівень супероксидного радикалу та пероксиду водню у клітині. Зниження активності КАТ може супроводжуватися

накопиченням пероксиду водню і посиленням його цитотоксичної дії [149]. Активність КАТ проростків сорту пшениці з низькою стійкістю за дії живих клітин адаптованого фітопатогену збільшувалась у 2,2 рази порівняно із контрольним варіантом. Разом з тим, підвищення активності КАТ у сорту Фаворитка на 50% зареєстровано також і у відповідь на обробку ЛПС адаптованого патогена. Активність КАТ у відповідь на обробку живими клітинами і ЛПС неадаптованого патогену незначно знижувалася.

Для сорту Дискус активність КАТ була вищою за контрольні значення у всіх варіантах досліду. Зокрема, за дії живих клітин неадаптованого та адаптованого фітопатогенів виявлено збільшення значень цього параметру на 55,5% та в 2,1 рази, відповідно, тоді як їх ЛПС обумовлювали зміни на меншому рівні відносно контрольного варіанту.

У сорту Подолянка, що є високостійким до впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens*, спостерігали зниження активності цього ензиму (рис 3.5.). Пригнічення активності КАТ за відсутності розвитку окиснювальних процесів може свідчити про оптимізацію функціонування антиоксидантної системи та ймовірне використання H_2O_2 у якості сигнальних молекул для ефективного захисту при патогенезі [150].

Отримані результати свідчать про те, що за дії фітопатогенних псевдомонад у сорту Фаворитка відбувається окиснювальний вибух, який призводить до колапсу системи антиоксидантного захисту та зумовлює окиснювальне пошкодження клітинних мембран. Отримані дані дають підстави вважати, що особливості функціонування системи антиоксидантного захисту можуть бути одним з важливих механізмів, що обумовлюють високу чутливість цього сорту до впливу *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Водночас, зниження активності СОД проростків помірно стійкого сорту Дискус може свідчити про виснаження субстрату цього ензиму, а підвищення активності КАТ демонструє ефективне знешкодження пероксиду водню, що перешкоджає розвитку окиснювальних процесів.

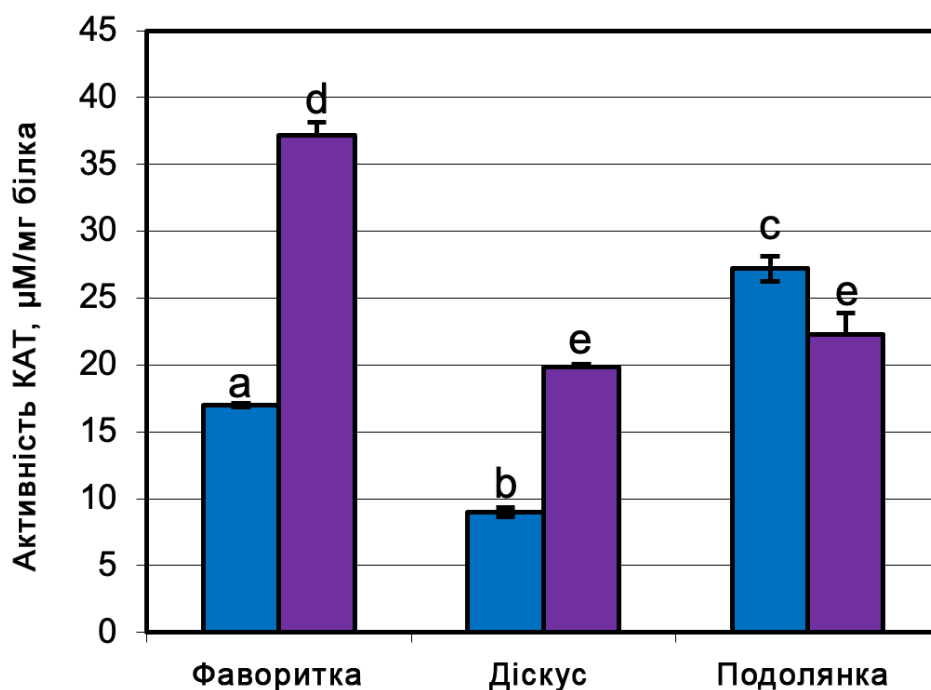


Рис.3.5. Активність каталази у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами. 1154- *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 1154; 1013 - *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ 1013; різні літери вказують на статистично вірогідні відмінності між сортами (ANOVA, тест Тьюки з поправкою Бонферроні, $P \leq 0,05$), за винятком вимірювань після впливу фітопатогенну (фіолетові стовпчики), які порівнювали з їх необробленими аналогами окремо за допомогою t-критерію Ст'юдента, $P \leq 0,05$ порівняно з відповідним необробленим контролем.

Неспецифічний механізм захисту рослин за патогенезу включає зміни метаболізму антиоксидантів неферментативної природи, зокрема, проліну [151]. Пролін є протеогенною амінокислотою, що може накопичуватися у вільній формі у рослинних тканинах за умов стресу, бере участь у осморегуляції та протекції біомолекул як молекулярний шаперон [152]. Недавні відкриття вказують на те, що пролін відіграє важливу роль у процесах росту та диференціації рослин протягом їхнього життєвого циклу. Пролін є ключовим компонентом багатьох білків клітинної стінки, а також важливим регулятором рослинного метаболізму в умовах осмотичного стресу [153]. Останнім часом у літературі збільшується кількість

даних щодо участі проліну у захисті рослин від патогенів і регуляції редокс-потенціалу клітин [151]. Зокрема, встановлено його роль як регулятора внутрішньоклітинного осмотичного потенціалу, стабілізатора клітинних структур, відмічено його участь у процесах відновлення і розвитку [154]. З одного боку, накопичення проліну у рослинній тканині може слугувати для нейтралізації АФК [155.]. З іншого боку, накопичення проліну спричиняє інтенсифікацію його окиснення проліндегідрогеназою з утворенням АФК [156]. Акумуляція проліну у рослинних тканинах внаслідок дії патогенних мікроорганізмів є однією з захисних реакцій.

Результати дисертаційного дослідження свідчать, що обробка зерна пшениці фітопатогенними псевдомонадами обумовлювала стрімке зростання вмісту проліну в проростках чутливого сорту Фаворитка, що у 8,5 разів перевищував значення контрольного варіанту (рис. 3.6).

Варто зазначити, що серед досліджуваних сортів найнижчий базальний рівень проліну спостерігали саме у тканинах проростків цього сорту пшениці. Разом з тим, виявлено статистично вірогідне накопичення проліну в усіх варіантах досліду із зерном цього сорту [157]. Зокрема, обробка живими клітинами адаптованого та неадаптованого патогенів, що найбільшою мірою обумовлювали перекисне окиснення ліпідів у рослинних тканинах, сприяла підвищенню вмісту проліну у 80 та 200 разів відповідно. Обробка ЛПС, незалежно від його походження, викликала накопичення проліну меншою мірою.

Обробка живими клітинами неадаптованого патовару фітопатогенних псевдомонад викликала також доволі значне накопичення проліну у тканинах проростків сортів з помірною (Дискус) і високою (Подольянка) стійкістю. У решті варіантів досліду з проростками цих сортів ми не спостерігали істотних змін у концентраціях проліну.

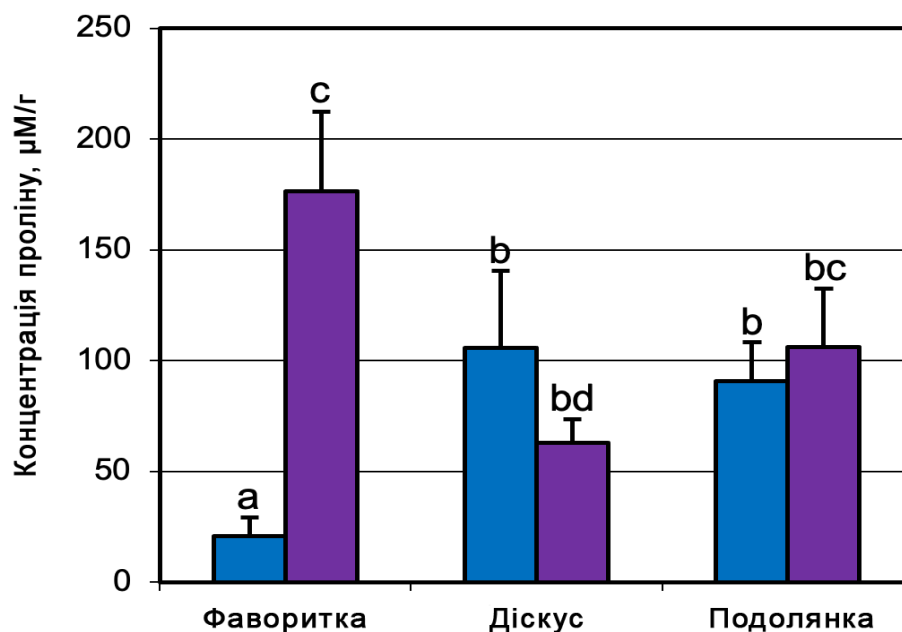


Рис. 3.6. Вміст вільного проліну у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами.

1154- *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 1154; 1013 - *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ 1013; різні літери вказують на статистично вірогідні відмінності між сортами (ANOVA, тест Тьюкі з поправкою Бонферроні, $P \leq 0,05$), за винятком вимірювань після впливу фітопатогену (фіолетові стовпчики), які порівнювали з їх необробленими аналогами окремо за допомогою t-критерію Ст'юдента, $P \leq 0,05$ порівняно з відповідним необробленим контролем.

З огляду на дані літератури [158], ми схильні припускати, що непропорційне накопичення вільного проліну може сприяти генерації АФК у проростках сорту Фаворитка. Таким чином, особливості метаболізму проліну, ймовірно, можуть опосередковувати у проростках сорту Фаворитка розвиток реакції гіперчутливості за дії фітопатогенних псевдомонад. Водночас, пролін може залучатися до синтезу гідроксипролін-багатих білків клітинної стінки – екстенсинів. Відомо, що за патогенезу спостерігається зростання вмісту екстенсинів, які можуть поєднуватись міжмолекулярними ковалентними зв'язками, укріплюючи клітинну стінку та перешкоджаючи розповсюдженню інфекції. Варто зазначити, що утворення такої

мережі відбувається під дією екстенсинпероксидаз, для функціонування яких необхідний H_2O_2 [159].

Отже, отримані результати вказують на взаємозв'язок між стійкістю пшениці до фітопатогенних псевдомонад та станом системи антиоксидантного захисту. Зокрема, показано, що стійкість до *P. syringae* pv. *atrofaciens* може бути пов'язана з відсутністю окиснювального стресу у проростках стійких сортів. Слід зазначити, що базальний рівень ТБК-активних сполук, а також базальний вміст проліну був вищим у стійких сортів порівняно з чутливим сортом. Сприйнятливість сорту Фаворитка до фітопатогенних псевдомонад може бути пов'язана, як зазначено вище, з «окиснювальним вибухом» та подальшим окисненням мембранних структур.

Збалансованість оксидантно-антиоксидантної системи і оксидативна толерантність рослин значною мірою залежать від фізіолого-біохімічних властивостей симбіотичних мікроорганізмів [1]. З огляду на це завданнями наступних етапів роботи було виділення ендofітних мікробних угруповань зерна пшениці з різною стійкістю до фітопатогенних псевдомонад, а також дослідження їх кількісних і функціональних характеристик.

3.3. Кількісні та функціональні властивості ендofітних мікроорганізмів зерна озимої пшениці з різною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад та їхніх ліпополісахаридів

На сьогоднішній день доведено присутність широкого спектру ендofітних мікроорганізмів, що колонізують різноманітні рослинні структури, у тому числі і зерно. Міцний союз між рослиною-господарем та ендofітами сприяє росту, підвищенню імунітету та посиленню стресостійкості рослин [8]. Крім того, у літературі були описані ендofітні бактерії з антагоністичним ефектом щодо збудників захворювань зернових культур, у т.ч. пшениці [113]. Як зазначено вище, симбіотичні ендofітні мікроорганізми впливають на стійкість рослини до

збудників інфекційних захворювань безпосередньо та опосередковано. Безпосередній вплив ендofітів на стійкість рослини до інфекційних захворювань реалізується за рахунок наявності антагоністичної активності щодо фітопатогенних мікроорганізмів у деяких представників ендofітів. Опосередкований позитивний вплив ендofітів на стійкість рослини-хазяїна до фітопатогенів забезпечується їх рiстстимулювальною активністю та здатністю підтримувати імунну активність. В останні два десятиліття біологічним механізмам стійкості сільськогосподарських рослин, у т.ч. ролі симбіотичної ендofітної мікробіоти, приділяється особлива увага, оскільки ендofітні мікроорганізми можуть бути використані у розробці мікробіотехнологічних препаратів для стимулювання росту і посилення стресостійкості сільськогосподарських культур, як елемент екологізації/біологізації сільськогосподарського виробництва.

З огляду на вище зазначене, наступним етапом роботи було виділення, морфолого-культуральна характеристика та дослідження біологічних властивостей бактеріальних ендofітів сортів озимої пшениці з різною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад та їхніх ЛПС. У цьому дослідженні використовувались три сорти пшениці, які, за результатами попереднього етапу роботи, характеризувалися високою (Подолька), помірною (Дискус) та низькою (Фаворитка) стійкістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013.

3.3.1. Кількісні характеристики та морфолого-культуральні властивості ендofітних бактерій зерна пшениці з різною чутливістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Всього було отримано тридцять два ізоляти ендofітних бактерій із сухого зерна трьох комерційних сортів озимої пшениці з різною стійкістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978: УКМ В-1013 *in vitro*. Виділення та облік культурабельних ендofітних мікроорганізмів проводили на 72 годину культивування поверхнево стерилізованого зерна на

поверхні поживного середовища R2A (рис 3.7.). Термін обліку росту бактеріальних зернових ендоситів був лімітований інтенсивним ростом грибної ендоситної мікробіоти після 72 діб культивування, як зазначено у розділі методів. Одинадцять бактеріальних ізолятів отримано із зернівок сорту Фаворитка, який, згідно даних виробника, характеризується високою зимостійкістю, середньою посухостійкістю та високою стійкістю до фітопатогенних грибів (див. Табл. 2.1. у розділі «Матеріали і методи досліджень»).

Згідно результатів досліджень, наведених у розділі 3.1, цей сорт характеризується низькою стійкістю зерна до *P. syringae* pv. *atrogena* УКМ В-1013 *in vitro*. Десять ізолятів було виділено із зерна сорту пшениці з високою стійкістю до стресів та грибних фітопатогенів, а також із середньою стійкістю до фітопатогенних псевдомонад (Дискус).

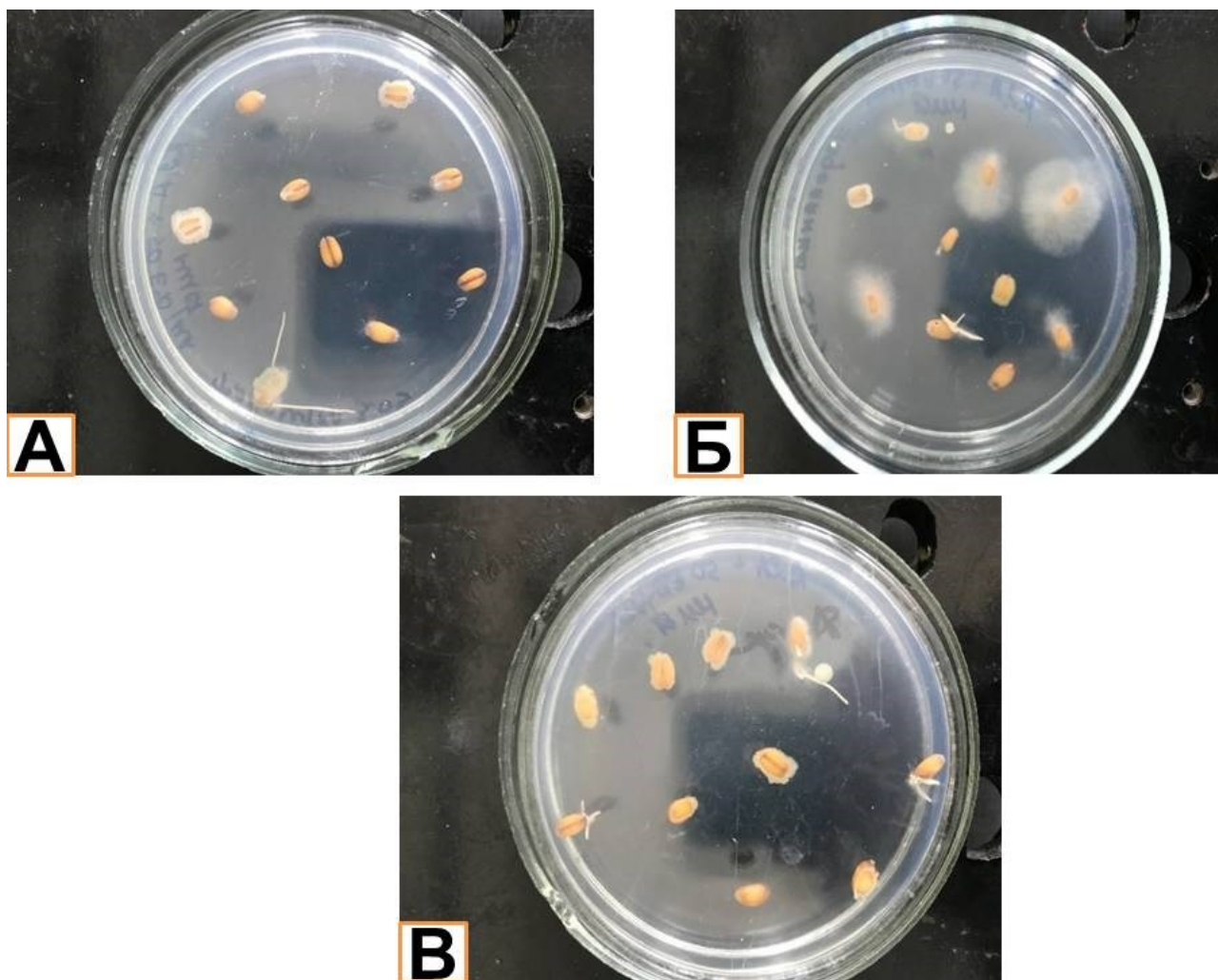


Рис.3.7. Проростання ендofітної мікробіоти на середовищі R2A. А- зерно сорту Подолянка, Б - зерно сорту Фаворитка, В – зерно сорту Дискус. Термін обліку 72 години

Одинадцять ізолятів отримано з зерна сорту Подолянки, пшениці із високою стійкістю до стресів, а також високою стійкістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013. Морфолого-культуральні властивості виділених ізолятів наведено у Таблиці 3.3.

Таблиця 3.3.

Морфолого-культуральні властивості виділених ізолятів ендofітних мікроорганізмів зерна пшениці

Ізолят	Форма	Розмір	Колір	Поверхня	Край	Консистенція	Морфологія клітин	Антагоніст и Коефіцієнт активності
Фаворитка								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
F1	Неправильна	Середній	Білий	Гладенька	Зазубрений	Слизиста	Грампозитивні коки	1,1±3,0
F2	Округла	Дрібні	Жовтий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грампозитивні коки	2,1±0,3
F3	Неправильна	Середній	Жовтий	Гладенька	Ризоїдальний	Слизиста	Грамнегативні палички групи неферментуючих бактерій	1,4±0,4
F4	Округла	Середній	Жовтий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Грампозитивні коки	1,7±0,4
F5	Округла	Середній	Жовтий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грампозитивні коки	1,4±0,2
F6	Неправильна	Середній	Рожевий	Гладенька	Ризоїдальний	Слизиста	Грамнегативні палички, олігонітотрофи	1,6±0,4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
F7	Округла	Середній	Білий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Грамнегативні палички, олігонітротрофи	1,1±0,3
F8	Округла	Дрібні	Жовтий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамположитивні коки	0,7±0,1
F9	Округла	Середні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамположитивні коки	1,1±0,2
F10	Округла	Великі	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамнегативні палички, олігонітротр	0,9±0,1
F11	Округла	Великі	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамположитивні коки	1,0±0,3
Дискус								
D1	Округла	Середній	Рожевий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Ендоспороформуєчі грамположитивні палички	1,5±0,4
D2	Округла	Дрібні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Ендоспороформуєчі грамположитивні палички	1,7±0,4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
D3	Округла	Дрібні	Жовтий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Спороутворюючі бацили	1,1±0,3
D4	Округлаа	Дрібні Діаметр > 1 мкм, довжина палички < 5 мкм	Білий	Глденька	Випуклий	Слизиста	Спороутворюючі бацили	1,3±0,2
D5	Округла	Дрібні <1 мм	Жовтий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Ендоспороформуючі грампозитивні палички	1,5±0,2
D6	Округла	Дрібні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Спороутворюючі бацили	1,3±0,3
D7	Округла	Середній	Жовтий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Спороутворюючі бацили	1,5±0,1
D8	Округла	Середній	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Спороутворюючі бацили	1,7±0,4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
D9	Округла	Дуже дрібні, менше 1мкм	Жовтий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Мікрокок, утв. угруповання по типу грона винограду	1,0±0,3
D10	Округла	Дрібні	Жовтий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Спороутворюючі бацили	2,4±0,4
Подолянка								
P1	Округла	Середній	Жовтий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Ендоспороформуючі Грамнегативні палички	1,3±0,3
P2	Округла	Середній	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамнегативні палички групи ферментуючих бактерій	1,0±0,4
P3	Неправильна	Дрібні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамнегативні палички	1,2±0,2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
P4	Неправильна	Дрібні	Жовтий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Ендоспороформуючі Грмпозитивні палички	1,1±0,2
P5	Округла	Великі	Жовтий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Ендоспороформуючі Грампозитивні палички	1,2±0,3
P6	Округла	Великі	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Ендоспороформуючі Грмпозитивні палички	2,3±0,1
P7	Округла	Дрібні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамнегативні палички, олігонітротрофи	1,2±0,4
P8	Округла	Дрібні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Гпалички групи неферментуючих бактерій	1,9±0,3
P9	Округла	Середні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Ендоспороформуючі Грмнегативні палички	2,2±0,1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
P10	Округла	Середній	жовтий	Гладенька	Випуклий	Слизиста	Ендоспороформуючі грампозитивні палички	2,7±0,3
P11	Неправильна	Дрібні	Білий	Гладенька	Рівний	Слизиста	Грамнегативні палички	1,5±0,1

Як видно з таблиці 3.3. та рисунку 3.8, бактеріальні морфотипи були представлені грамнегативними паличками, спороутворюючими бацилами та грампозитивними коками. Грамнегативні палички переважали у ендofітному угрупованні високостійкого до фітопатогенних псевдомонад сорту пшениці Подолянка, спороутворюючі бацили були переважаючим морфотипом у ізолятів ендofітів сорту пшениці із середньою стійкістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 Діскус. У ендofітному угрупованні сорту пшениці з низькою стійкістю до фітопатогенних псевдомонад (Фаворитка) значну частку склали грампозитивні коки. Вміст ендofітних бактерій у зернах різних сортів пшениці варіював від $1,7 \times 10^2$ до $2,5 \times 10^5$ КУО на г сухої маси зерна. Найвище значення ($2,5 \pm 1 \times 10^5$) виявлено в зерні сорту пшениці Діскус із середньою стійкістю до досліджуваного фітопатогену, а найнижче значення ($1,7 \pm 0,5 \times 10^2$) зареєстровано у зерні сорту пшениці Фаворитка з низькою стійкістю до фітопатогенних псевдомонад.

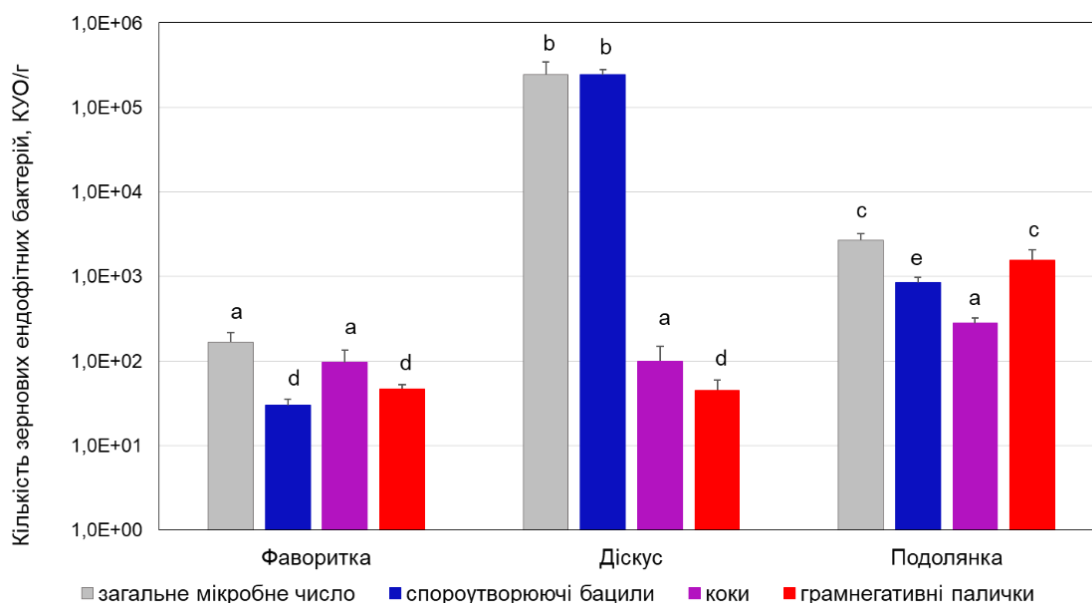


Рис. 3.8. Кількісні характеристики та морфотипи культурабельних ендofітних бактерій ендofітів пшениці з різною чутливістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013 статистично вірогідні відмінності між групами порівняння позначені різними літерами (ANOVA, post-hoc тест Тьюки з поправкою Бонфероні).

Таким чином, зареєстровано відмінності у кількісних характеристиках та морфотипах зернових ендоефітних бактерій залежно від стійкості сорту пшениці до фітопатогенних псевдомонад *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013 і виявлено, що висока стійкість асоційована з високим вмістом культурабельних зернових ендоефітних бактерій, які належать до споро утворюючих бацил та грамнегативних паличок. Наступним кроком було вивчення фізіолого-біохімічних характеристик виділених ендоефітних бактерій.

3.3.2. Функціональні характеристики ендоефітних бактерій зерна пшениці з різною чутливістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Ефективний симбіоз ендоефітних мікроорганізмів із рослиною-хазяїном реалізується за рахунок трансформації макро-і мікроелементів ферментативними системами бактерій у біодоступну для рослин форму, а також завдяки синтезу симбіотичними мікроорганізмами біологічно активних сполук з ріст-стимулювальною активністю. Найважливішими для рослини фізіологічними властивостями симбіотичних бактерій є їх здатність до фіксації азоту, сольобілізації фосфору, а також синтез індольних сполук – гетероауксинів, які стимулюють ріст вегетативних частин рослини, утворення коренів тощо [160]. саме ці фізіологічні властивості ендоефітних зернових бактерій стали предметом дослідження наступного етапу роботи.

З 32 бактеріальних ізолятів 20 (62,5%) виявляли різні види рістстимулювальної активності. Найбільша кількість фізіологічно активних бактерій була присутня у складі зернового ендоефітного угруповання сорту Діскус (245 000 КУО/г сухого зерна). У складі ендоефітів сорту Подолянка виявлено значно меншу загальну кількість фізіологічно активних зернових ендоефітних бактерій – 2700 КУО/г. Найменшу кількість культурабельних фізіологічно активних зернових ендоефітних бактерій виділено у сорту Фаворитка – 168 КУО/г. Найвища частка бактерій (від загальної кількості виділених мікроорганізмів) з

рістстимулювальними властивостями виявлена в ендодітрі високостійкого сорту пшениці Подолянка (рис.3.9). У ньому переважали фосфатсолубілізуючі бактерії і продуценти індоламінооцтової кислоти (78% від загальної кількості культурабельних зернових ендодітних мікроорганізмів), які за морфологією належали до грамнегативних паличок (62% та 63% відповідно) та споротвірних бацил (16% та 15% відповідно). Доволі значну частку (56% від загальної кількості) становили також олігонітотрофи, які за морфологією також належали до грамнегативних паличок (37%) та спороутворюючих бацил (19%). Насіння спільнота сорту пшениці із середньою стійкістю до досліджуваного фітопатогену (Дискус) була переважно представлена спороутворюючими бацилами з олігонітотрофною активністю (33%). Незначну частку олігонітотрофів складала грамнегативні палички (4%). Частка ендодітних бактерій з фосфатсолубілізуючою здатністю та здатністю продукувати індольні сполуки була мінімальною. Ендодіт низькостійкого сорту містив найменшу частку бактерій з рістстимулювальними властивостями, серед яких були представлені бактерії з усіма досліджуваними видами біологічної активності. У ньому були присутні олігонітотрофи, представлені як грамнегативними паличками, так і спороутворюючими бацилами, а також фосфатсолубілізуючі грамнегативні палички та продуценти індоламінооцтової кислоти, які належали до того ж морфотипу. Низька частка фізіологічно активних культурабельних мікроорганізмів у складі ендодітного зернового угруповання сорту Фаворитка може пояснюватися значним переважанням морфотипу грампозитивних коків. Згідно даних літератури, мінерал-солубілізуючі властивості та здатність до фіксації азоту та олігонітотрофії більш притаманні паличкоподібним бактеріям (як неспоротвірним, так і споротвірним) і значно менш властива кокоподібним бактеріям у складі угруповань як ендодітних, так і екзодітних мікроорганізмів [161,162].

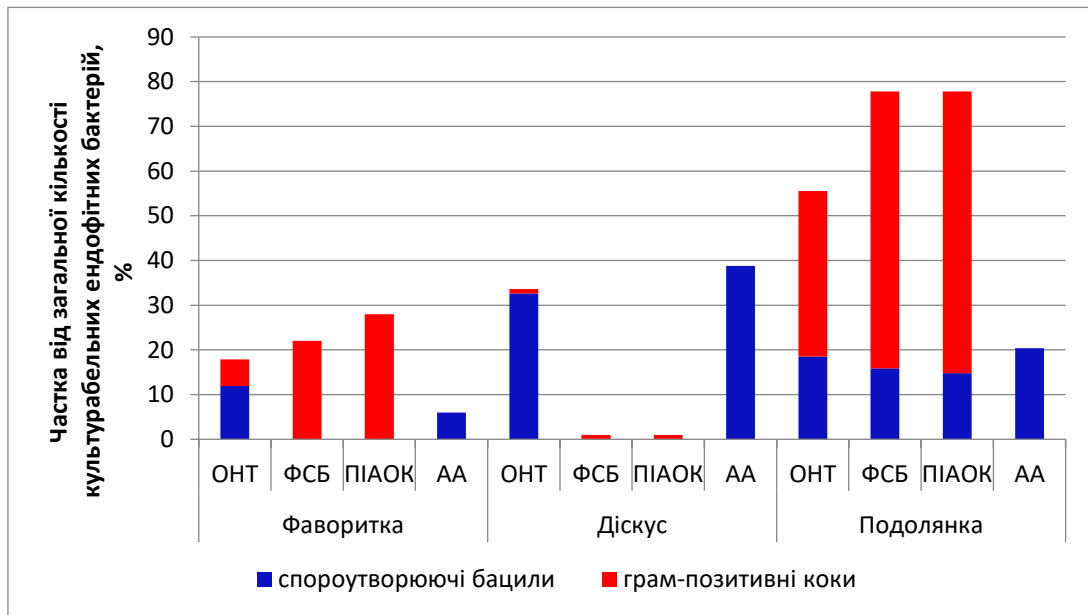


Рис.3.9. Рістстимуловальні властивості симбіотичної ендоефітної мікробіоти пшениці з різною чутливістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. ОНТ - олігонітротрофи, ФСБ – фосфатсолубілізуючі бактерії, ПІАОК - бактерії продуценти індоламінооцтової кислоти, АА – бактерії з антагоністичною активністю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ Б 1013

Деякі ізоляти ендоефітів виявляли одночасно два або навіть три різні рістстимуловальні властивості (рис. 3.10). У жодному з досліджених ендоефітних угруповань не виявлено бактерій, які володіли б виключно фосфатсолубілізуючою активністю. Слід зазначити, що найбільша частка зернових бактеріальних ізолятів, що проявляли усі три рістстимуловальні властивості, була зареєстрована у сорту пшениці з найвищою стійкістю до фітопатогену - Подолянка. Найвищою серед усіх трьох досліджених сортів була в ендоефіті цього сорту також частка олігонітротрофних ендоефітів зі здатністю до фосфатсолубілізації [145]. Бактерії, які володіли виключно олігонітротрофною активністю або олігонітротрофною активністю у поєднанні зі здатністю синтезувати індольні сполуки, були відсутні у цій ендоефітній спільноті.

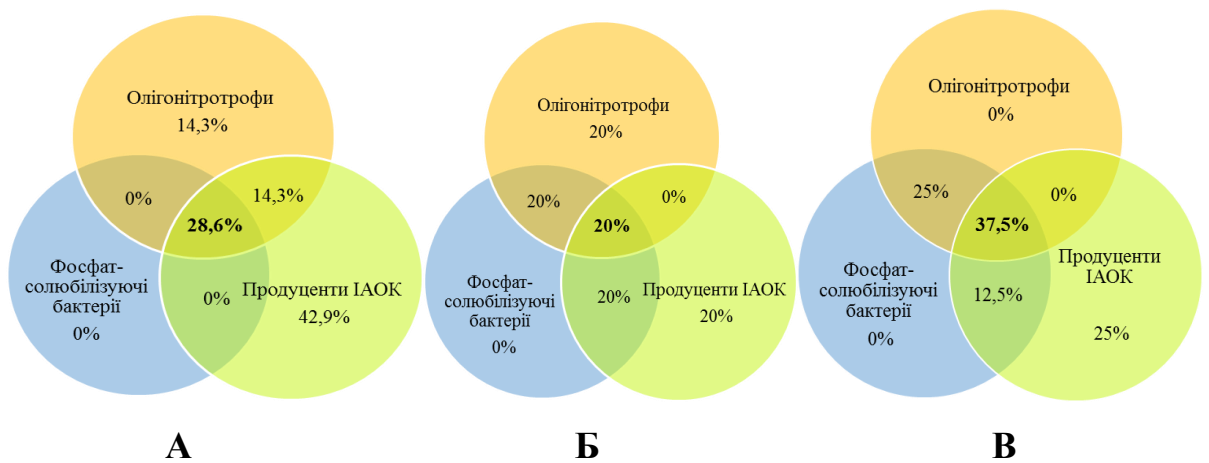


Рис.3.10. Діаграми Венна співвідношень фізіологічних груп у складі насінневих ендofітних бактеріальних угруповань. дані представлені як відсоток від загальної кількості функціонально активних ізолятів. А - симбіотична ендofітна мікробіота пшениці сорту Фаворитка; Б - симбіотична едофітна мікробіота пшениці сорту Діскус; В - симбіотична ендofітна мікробіота пшениці сорту Подолянка. Частка мікроорганізмів, що проявляли одночасно три види фізіологічної активності, виділена жирним шрифтом.

Однією з особливостей ендofітного угруповання сорту Діскус також була відсутність бактерій, що одночасно володіють олігонітротрофною активністю та здатністю до продукції індольних сполук. Натомість, частка бактерій з виключно олігонітротрофною активністю була найвищою. Відмінними рисами фізіологічної активності ендofітних бактерій сорту Фаворитка була відсутність олігонітротрофів зі здатністю до солубілізації фосфатів, відсутність фосфатсолубілізаторів зі здатністю до продукції індольних сполук і найвища частка бактерій, які характеризувалися виключно здатністю до продукції індоламінооцтової кислоти.

Підсумовуючи порівняльний аналіз фізіологічних рістстимулювальних властивостей зернових ендofітів сортів пшениці з різною стійкістю до фітопатогенних псевдомонад слід зазначити наступне. Стійкість до досліджуваного фітопатогену була асоційована з найбільшою часткою зернових ендofітів, що володіли одночасно кількома рістстимулювальними властивостями:

загальна частка ендоефітів з більше, ніж однією рiстстимулювальною активністю у складі ендоефіту сорту Подолянка була 75%, у сорту Дискус – 60%, Фаворитка – 42,9%. Низька стійкість була пов’язана з найвищою часткою ендоефітних бактерій, що виявляли лише одну з рiстстимулювальних фізіологічних властивостей. Це свiдчить про те, що наявність у складі культурабельної ендоефітної мікробіоти бактерій з множинними рiстстимулювальними властивостями може бути одним з механiзмів стійкості до фітопатогенних псевдомонад. Виділені нами ізоляти з множинними рiстстимулювальними властивостями можуть представляти інтерес з точки зору розробки біотехнологічних препаратів для використання у сільському господарстві.

3.3.3. Антагоністичні властивості ендоефітних бактерій зерна пшениці з різною чутливістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Антагоністичну активність ізольованих насінневих ендоефітних бактерій перевіряли щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013. З 32 виділених ізолятів 5 показали різну ступінь антагоністичної активності щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 шляхом утворення характерних чітких зон затримки росту збудника навколо лунки із внесеною добовою культурою ендоефітного мікроорганізму (рис.3.11).

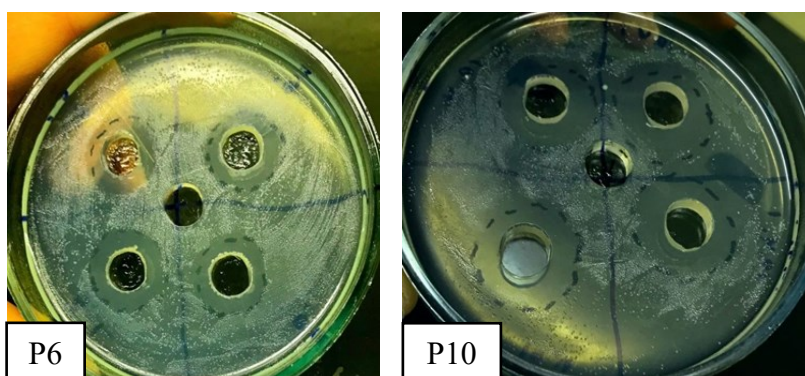


Рис. 3.11. Репрезентативні ілюстрації антагоністичної активності ізолятів ендоефітних бактерій (P6 та P10) зернівок пшениці сорту Подолянка, стійкого до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

Ендофітні бактерії з антагоністичною активністю відносно фітопатогену були присутні у зерновій спільноті всіх досліджених сортів пшениці. Морфолого-культуральні властивості бактерій-антагоністів наведено у таблиці 3.3.

Усі ендофітні бактерії з антагоністичною активністю до фітопатогенних псевдомонад належали до морфотипу спороутворюючих бацил (рис. 3.12).

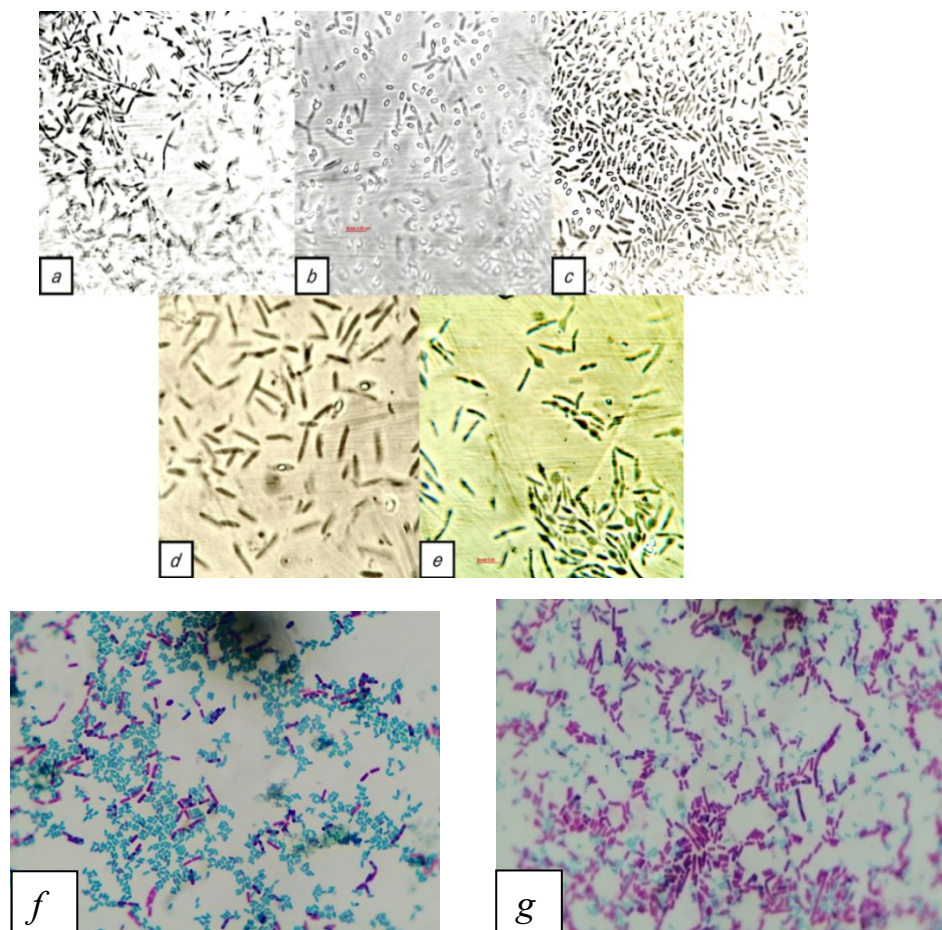


Рисунок 3.12. Репрезентативні мікроскопічні препарати ендофітних бактерій з антагоністичною активністю. а – е – фазово-контрастна мікроскопія, бар = 5 мкм: а – D5, b – D2, c – F1, d – P10, e – P6. f і g – імерсійна світлова мікроскопія, фарбування спор за Шефером-Фултоном, збільшення x200: f – D2, g – D5. Спори забарвлені зеленим кольором, вегетативні клітини – рожевим

Ендофітні бактерії з антагоністичною активністю склали найбільшу частку серед усіх культурабельних зернових ендофітних бактерій у складі угруповання сорту Діскус – 39% (рис. 3.9), що становило в абсолютній кількості 95 000 КУО/г сухого зерна (табл. 3.4). Загалом із цього сорту було виділено два ізоляти з

антагоністичною активністю: D2 і D5 [163]. Із зерна сорту Подолянка були отримані два ізоляти з антагоністичною активністю: P6 та P10. Частка цих мікроорганізмів у загальній кількості культурабельних ендofітних бактерій складала 20% (рис.3.9), абсолютна кількість – 550 КУО/г сухого зерна (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Характеристики ендofітних бактерій з антагоністичною активністю до *P. syringae* pv. УКМ В- 1013

Сорт	Кількість ендofітних бактерій з антагоністичною активністю, КУО/г (частка від загальної кількості ендofітних бактерій з антагоністичною активністю, %)	Назва ізоляту	Антагоністична активність (діаметр зони затримки росту, мм)	Рістстимульовальні властивості
Фаворитка	10(6)	F1	21,0 ± 3,0	–
Дискус	95000 (39)	D2	15,2 ± 2,0	–
		D5	24,0 ± 4,0	–
Подолянка	550 (20)	P6	23,0 ± 1,0	Олігонітотрофія, солюбілізація фосфатів, синтез індольних сполук
		P10	27,0 ± 3,0	Синтез індольних сполук

У складі ендofітів сорту з низькою стійкістю до *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В- 1013. Фаворитка було виділено один ізолят з антагоністичною активністю – F1. Частка бактерій з антагоністичною активністю у зерновому ендofіті цього сорту складала 6% (рис.3.9), абсолютна кількість – 10 КУО/г сухого зерна.

Найбільш виразну антагоністичну активність до фітопатогенних псевдомонад зареєстровано у ізоляту P10: діаметр зони затримки росту $2,7 \pm 0,3$. Приблизно однакову антагоністичну активність виявлено у ізолятів D5 ($2,4 \pm 0,4$) та P6 ($2,3 \pm 0,1$). Варто відмітити, що ізолятам ендofітних бактерій із сорту Подолянка, на додачу до антагоністичної активності, були притаманні рістстимульовальні ефекти. Зокрема, бактерії ізоляту P10 характеризувалися

здатністю до продукції індольних сполук. Клітинам ізоляту P10 були властиві ріст на безазотистому середовищі, здатність солюбілізувати фосфати та продукувати індольні сполуки.

Підводячи підсумок результатів дослідження цієї частини дисертаційної роботи слід зазначити, що висока стійкість до *P. syringae* pv. *atrofaciens* асоціюється з високою часткою антагоністів у загальній кількості культивованих ендofітних бактерій та бактерій, що володіють одночасно трьома рістстимульовальними фізіологічними властивостями: фосфатсолюбілізація, фіксація азоту та вироблення індоламінооцтової кислоти. Виділені штами ендofітних бактерій з антагоністичною активністю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* можуть розглядатися як перспективний об'єкт для біотехнології засобів біозахисту зернових проти бактеріозів, спричинених фітопатогенними псевдомонадами.

3.3.4. Ідентифікація ендofітних зернових бактерій пшениці з антагоністичною активністю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013

Зважаючи на перспективність виділених ізолятів зернових ендofітних бактерій з точки зору їх використання для створення агробіотехнологічних препаратів захисту зернових культур від фітопатогенних псевдомонад, наступним завданням роботи була ідентифікація виділених ізолятів із застосуванням різних методологічних підходів.

Першим кроком в ідентифікації мікроорганізмів є фенотипова оцінка зростаючої колонії. У багатьох випадках морфолого-культуральні характеристики та характеристики росту на різних селективних і диференційних середовищах дозволяють ідентифікувати мікроорганізм до рівня родини, роду і, у деяких випадках, навіть до виду. Наступним рівнем ідентифікації є оцінка біохімічного профілю мікроорганізму, яка дозволяє у багатьох випадках ідентифікувати мікроорганізм до виду. Оцінку біохімічного профілю виділених ізолятів бактеріальних ендofітів проводили на мікробіологічному аналізаторі VITEK® 2Compact (Табл.3.5).

Таблиця 3.5.

Біохімічна ідентифікація ендофітних бактеріальних ізолятів за допомогою картки VITEK / BCL

Ізолят P6. <i>Paenibacillus peoriae</i> / <i>Paenibacillus polytuxa</i> . Ідентифікаційний код зразка 5352550515047161. Точність ідентифікації 89%																	
1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	+	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	-	11	AGAL	+	12	AlaA	-	13	TyrA	(-)	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	+	21	GLYG	+	22	INO	-	24	MdG	+
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	+	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	+	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	+	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	+
50	INU	+	53	dGLU	+	54	dRIB	+	56	PSCNa	-	58	NaCl	-	59	KAN	+
60	OLD	+	61	ESC	+	62	TTZ	(+)	63	POLYB_R	+						
Ізолят P10. <i>Brevibacillus brevis</i> / (<i>Brevibacillus agri</i>). Ідентифікаційний код зразка 4420100000200401. Точність ідентифікації 87%.																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	(+)	5	LeuA	-	7	PheA	(-)	8	ProA	+
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
9	BGAL	-	10	PyrA	+	11	AGAL	-	12	AlaA	-	13	TyrA	-	14	BNAG	-
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	(-)
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	+	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl	-	59	KAN	+
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB_R	+						
Ізолят D2. <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i> . Ідентифікаційний код зразка 1372271715457261. Точність ідентифікації 33/33/33%.																	
1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+	11	AGAL	+	12	AlaA	-	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	-	18	CDEX	+	19	dGAL	-	21	GLYG	(+)	22	INO	+	24	MdG	+
25	ELLM	+	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	+	30	GlyA	+	31	dMAN	+
32	dMNE	+	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	+	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	(-)	44	PHC	-	45	PVATE	+	46	AGLU	+	47	dTAG	-	48	dTRE	+
50	INU	+	53	dGLU	+	54	dRIB	+	56	PSCNa	-	58	NaCl	+	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB_R	+						
Ізолят D5. <i>Bacillus pumilus</i> . Ідентифікатор зразка 1353045614466261. Точність ідентифікації 96%.																	
1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	-	11	AGAL	+	12	AlaA	+	13	TyrA	+	14	BNAG	-

15	APPA	-	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	(-)	24	MdG	+
25	ELLM	+	26	MdX	-	27	AMAN	+	29	MTE	-	30	GlyA	+	31	dMAN	+
32	dMNE	+	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	+	46	AGLU	-	47	dTAG	+	48	dTRE	+
50	INU	-	53	dGLU	+	54	dRIB	+	56	PSCNa	-	58	NaCl	(+)	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB_R	+		6.5%				

Ізолят F1. *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus*. Ідентифікатор зразка 5372071515657261. Точність ідентифікації 33/33/33%.

1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	(+)	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+	11	AGAL	+	12	AlaA	-	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	-	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	+	22	INO	+	24	MdG	+
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
25	ELLM	+	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	+	30	GlyA	(-)	31	dMAN	+
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
32	dMNE	+	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	+	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	-	44	PHC	+	45	PVATE	+	46	AGLU	+	47	dTAG	-	48	dTRE	+
50	INU	+	53	dGLU	+	54	dRIB	+	56	PSCNa	-	58	NaCl	+	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB_R	+		6.5%				

Примітка: * Результати реакцій, які показані в дужках «(-)» або «(+)», вказують на слабкі реакції,

BXY – бета ксилосидаза; LysA – лізин аріламідаза; AspA – аспартат аріламідаза; LeuA – лейцин аріламідаза; PheA – фенілаланін аріламідаза; ProA – пролін аріламідаза; BGAL – бета галактозидаза; PyrA – піролідоніл аріламідаза; AGAL – альфі галактозидаза; AlaA – аланін аріламідаза; TyrA – тирозин аріламідаза; BNAG – бета – N – ацетил глюкозамінідаза; APPA – аланін, феніл, пролін аріламідаза; CDEX – циклодекстрин; dGAL – Д – галактозидаза; GLYG – глікоген; INO – міо інозитол; MdG – метил – А – Д – глюкопіранозид; ELLM – елман; MdX – метил – Д – ксилозид; AMAN – альфа манозидаза; MTE – мальтотріоза; GlyA – гліцин аріламідаза; dMAN – Д-манітол; dMNE – Д – маноза; dMLZ – Д – мелезітоза; NAG – N- ацетил – D – глюкозамін; PLE – пай атиноз; IRHA – L – рамноза; BGLU – бета глюкозидаза; BMAN – бета – манозидаза; PHC – фосфорил холін; PVATE – піруват; AGLU – альфа – глікозидаза; dTAG – Д – тагатоza; dTRE – Д – тригалаза; INU – інулін; dGLU – Д-глюкоза; dRIB – Д-рибоза; PSCNa – путресцин; KAN – канаміцин резистентні; NaCl – натрію хлорид; OLD – оландоміцин резистентні; ESC – ескулін; TTZ – тетразолій червоний; POLYB_R – поліміксин –В- резистентні.

За результатами цих досліджень ізолят P6 мав біохімічний профіль, типовий для *Paenibacillus peoriae/Paenibacillus polymyxa*. Вірогідність (точність) ідентифікації склала 89%. *Paenibacillus* – великий рід грамполозитивних,

факультативно-анаеробних, ендоспороутворюючих бактерій. Рід *Paenibacillus* на даний час включає понад 150 ідентифікованих видів, приблизно 20 з яких мають здатність фіксувати азот. Штами *Paenibacillus*, що фіксують N₂, потенційно можуть використовуватися як бактеріальне добриво у сільському господарстві [165]. За результатами порівняльного геномного аналізу було висунуто припущення, що широка група *Paenibacillus* може виконувати сольобілізацію фосфатів, продукуючи глюконати органічних кислот, оскільки у кількох видів *Paenibacillus* (наприклад, *P. polytuxa*, *P. peoriae* і *Paenibacillus sp.*) виявлено гени, що кодують глюкозо-1-дегідрогенази та глюконатдегідрогенази [166]. Бактеріям цього роду притаманний синтез індол-3-амінооцтової кислоти та інших гетероауксинів [167]. Ендofітні бактерії роду *Paenibacillus*, виділені з зерна кукурудзи, володіють антагоністичною активністю до фітопатогенних грибів [168] та широкого спектру фітопатогенних бактерій [169]. Отже отримані нами результати узгоджуються з даними літературними і дозволяють розглядати цей ендofітний ізолят бактерій, як один з найбільш перспективних для створення агробіотехнологічних препаратів.

Ізолят P10 біохімічний профіль, типовий для *Brevibacillus brevis* / *Brevibacillus agri*. Вірогідність (точність) ідентифікації склала 87%. Згідно даних літературних, антагоністична активність бактерій роду *Brevibacillus* щодо грамнегативних бактерій може пояснюватися їх здатністю до синтезу нерибосомального пептиду з антимікробною активністю (мартіапептид А), стрептоцидину D і незвичайного лізофосфоліпиду з антимікробною активністю [170]. Для багатьох ізолятів *Brevibacillus brevis*, виділених з угруповань симбіотичної мікробіоти рослин, доведено здатність сольобілізувати фосфати, що узгоджується з отриманими нами даними [171]. Ізоляти D2 і F1 мали біохімічний профіль, типовий для бацил групи *Subtilis*: *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus*. Точність ідентифікації 33/33/33%. У літературі присутні численні повідомлення щодо антагоністичної активності бактерій групи *Bacillus subtilis* до фітопатогенних грибів [172, 173], а також щодо їх здатності модулювати біоплівкоутворення та синтез вторинних метаболітів мікроорганізмами у складі симбіотичних угруповань рослин [174].

Здатність рости на безазотних поживних середовищах, солюбілізувати фосфати та продукувати індольні сполуки нами не була виявлена для цих ізолятів. Натомість у літературі є повідомлення про притаманність зазначених властивостей для бактерій цієї групи [175]. Імовірно, реалізація цих властивостей у виділених нами ізолятів реалізується у консорціумі і потребує додаткових досліджень.

Ізолят D5 мав біохімічний профіль, типовий для *Bacillus pumilus* – мікроорганізму, для якого властиві, згідно даних літературних ріст-стимулювальні властивості [176], які, за результатами наших експериментів також не виявлені. Неузгодженість отриманих нами даних з даними літератури також вимагає додаткових досліджень фізіологічних властивостей цього ізоляту. Натомість, встановлені нами антагоністичні властивості цього ізоляту щодо фітопатогенних мікроорганізмів узгоджуються з даними літератури [178].

Результати ідентифікації виділених ізолятів ендоефітних бактерій з антагоністичною активністю щодо *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* були підтверджені при дослідженні їх мас-спектрів (Табл.3.6, рис.3.13).

Таблиця 3.6.

Точність ідентифікації ендоефітних бактеріальних ізолятів за допомогою Vitek MS-

DS

Ізолят	Назва	Ідентифікатор слайду	Точність ідентифікації, %
P6	<i>Paenibacillus peoriae/ Paenibacillus polymyxa</i>	202012041	99.9
P10	<i>Brevibacillus brevis / (Brevibacillus agri)</i>	202012041	99.9
D2	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	202009233	33.3/33.3/33.3
D5	<i>Bacillus pumilus</i>	202009233	99.9
F1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	202012041	33.3/33.3/33.3

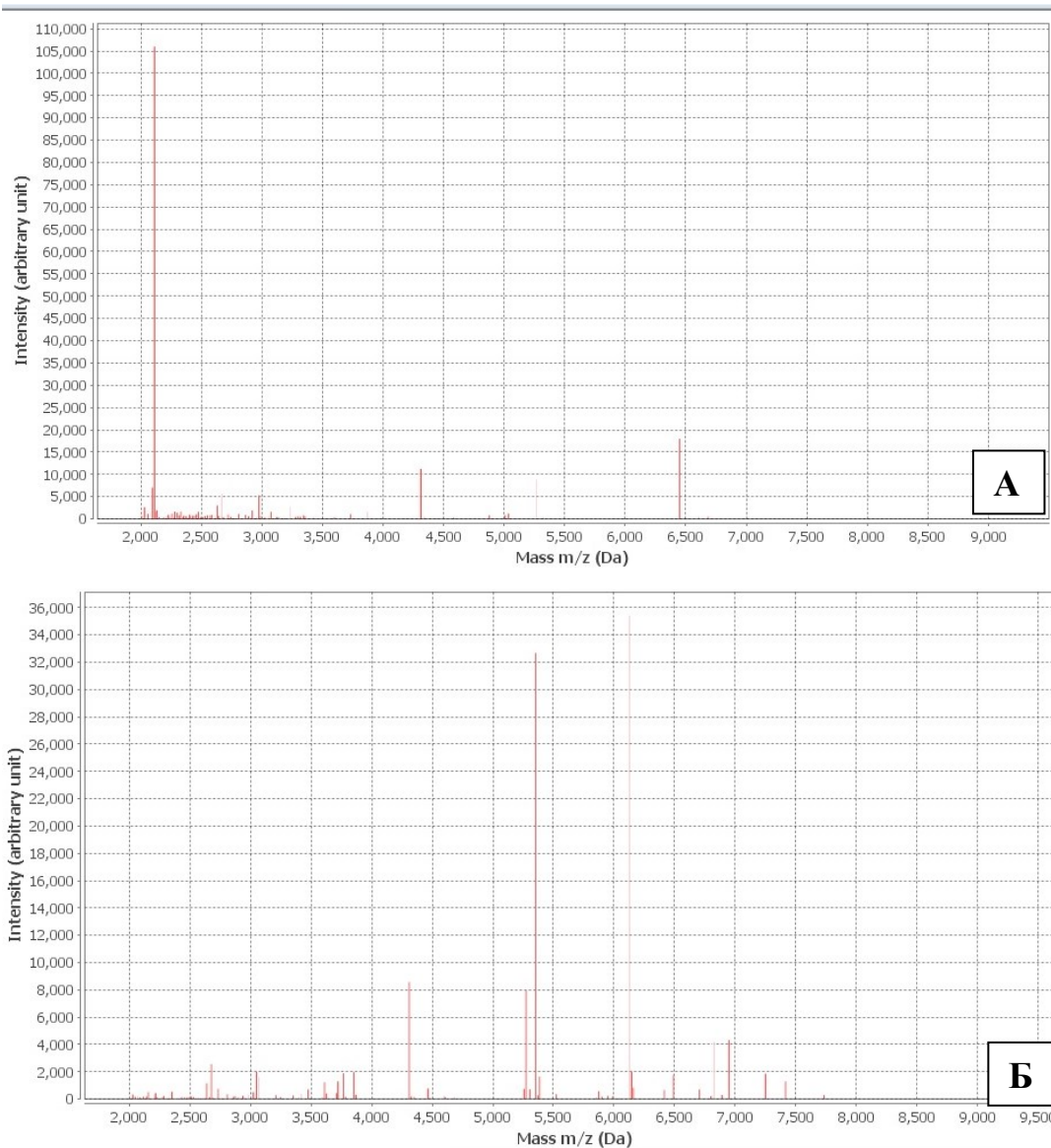


Рисунок 3.13. Репрезентативні мас-спектри ендofітних бактерій пшениці сорту Дискус з антагоністичною активністю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013. А – ізолят D2, Б - ізолят D5.

Точність ідентифікації була порівняною з такою для ідентифікації за біохімічним профілем, однак все ще не дозволила провести ідентифікацію до виду отриманих ізолятів.

Наступним методом, який був застосований нами для ідентифікації виділених ізолятів, був метод секвенування гена 16S рРНК (рис.3.14).

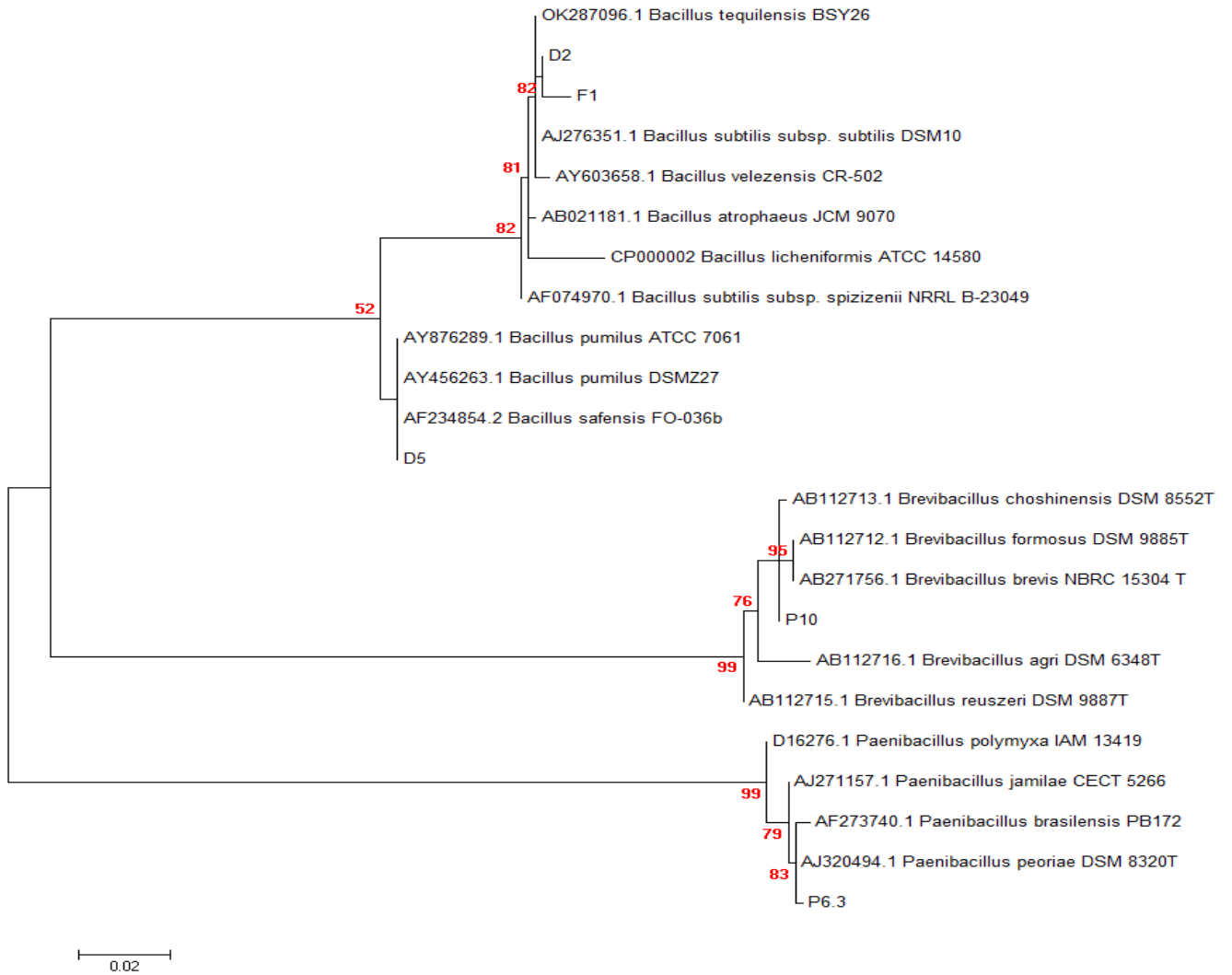


Рисунок 3.14. Філогенетичне дерево, побудоване на основі порівняння послідовностей гена 16S рРНК. Множинне вирівнювання послідовностей виконано за допомогою філогенетичного інструменту Muscle, коригування розмірів вирівнюваних послідовностей виконано за допомогою алгоритму Gblocks, побудова філогенетичного дерева здійснювалась за методом найбільшої правдоподібності (Maximum Likelihood) за допомогою інструменту PhyML з подальшою візуалізацією у інструменті TreeDyn в рамках онлайн-сервісу <http://www.phylogeny.fr/>. Довжина гілок відображає еволюційну дистанцію між штамми, числові значення відображають достовірність вузлів (1-максимально достовірний вузол).

Серед штамів (F1, D2, D5, P6, P10) найбільш спорідненими між собою виявились штами F1 та D2 (відсоток ідентичності 99.43% при перекритті запитуваної послідовності на 99%). Порівняння із типовими послідовностями дозволило віднести їх до роду *Bacillus*, філогенетичної групи *Bacillus subtilis*, що включає види *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. velezensis*, *B. tequilensis*, *B. licheniformis*. Для цих видів подібність послідовності 16S рРНК складає вище 98-99% і не дозволяє дискримінувати між видами [179].

Серед решти досліджених штамів, найбільш подібними до клади штамів F1 та D2 був штамп D5, якого також було віднесено до роду *Bacillus*, втім відмінної філогенетичної групи видів – *Bacillus pumilus*, що включає види *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. altitudinis*, *Bacillus xiamenensis* та деякі інші. Послідовність гена 16S рРНК типових штамів даних видів має подібність не вище 96% із типовими штамми видів групи *B. subtilis*. Це характерно і для послідовності даного гена у штаму D5. Його ген 16s рРНК має 95,6% та 95,05% ідентичності із таким штамів D2 та F1, відповідно, при перекритті послідовності 96%. В той же час, із типовими штамми *B. pumilus* та *B. safensis* має 100% ідентичності при перекриванні послідовності на 97%.

Більш віддаленими від клади штамів F1 та D2 виявились штами P10 та P6, які було ідентифковано до родів *Brevibacillus* та *Paenibacillus*, відповідно. Так, послідовність 16S рРНК штама P10 має лише 88,87% та 88,25% ідентичності із штамми D2 та F1, відповідно, при перекритті запитуваної послідовності на 98%. В той же час, із типовими штамом виду *Brevibacillus brevis* він має 99.57% ідентичності при перекриванні запитуваної послідовності на 98%. Втім, для різних видів роду *Brevibacillus*, зокрема, *Brevibacillus choshinensis*, *Brevibacillus formosus*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus reuszeri* та деяких інших, послідовність 16S рРНК також не дозволяє дискримінувати між видами. Штамп P6 характеризується дещо нижчим відсотком ідентичності відносно штамів F1 та D2 (85.80% та 85.21%, відповідно при перекритті 96% та 97%). Із типовим штамом виду *Paenibacillus polytuxa* ступінь ідентичності сягає 99.00% при перекритті 98%. Традиційно для цієї групи мікроорганізмів, послідовність 16S рРНК не дозволяє ідентифікації до

виду, тож даний ген має більш ніж 99% ідентичності також із такими типових штамів видів *Paenibacillus peoriae*, *Paenibacillus jamilae*, *Paenibacillus brasiliensis*, тощо. Для подальшої ідентифікації та визначення видової приналежності даних мікроорганізмів може бути застосоване порівняння послідовностей таких філогенетичних маркерів, як гена сенсорного білка регулону метаболізму фосфату *phoR*, гена субодиниці В ДНК-гірази *gyrB* [180] гена ДНК-гелікази *recQ* [181], тощо.

Отже, наші дані підтверджують наявність багатого бактеріального ендоефітного співтовариства в зерні озимої пшениці трьох різних за стійкістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* сортів. В едофіті стійкого сорту Подолянка переважали грамнегативні палички, в чутливого сорту Фаворитка грампозитивні коки. Деякі культурабельні ендоефітні бактерії володіли двома і навіть трьома рістстимулювальними властивостями одночасно. Ми виявили два бактеріальні ізоляти виділені із стійкого сорту Подолянка з множинними рістстимулювальними властивостями та антагоністичною активністю щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Виділені ізоляти за біохімічним профілем, маспектрометричним аналізом та секвенуванням гена 16S рРНК були віднесені до родів *Paenibacillus* та *Brevibacillus* їх можна розглядати як перспективні об'єкти для агробіотехнології.

Обговорення результатів

Пшениця злакова культура, яка заслужено займає провідну позицію у рейтингу продуктів харчування у близько 55 країнах світу. Україна також входить до цього переліку, та, окрім того, є потужним виробником та експортером цієї злакової культури. Близько 240 мільйонів гектарів в світі засаджені цим злаком щорічно. Збудники хвороб, шкідники та бур'яни є основними факторами, що не дозволяють формувати високі врожаї зернових культур. Відомо ряд хвороб, які знижують потенціал і якість врожаю зерна пшениці [182]. Серед збудників захворювань пшениці найчисленнішу групу складають мікроскопічні гриби [29]. Друге місце за нанесенням економічних збитків належить фітопатогенним вірусам [183-184], третє - бактеріям [13]. Найнебезпечнішим і найпоширенішим збудником бактеріальних хвороб пшениці вважають бактерії роду *Pseudomonas* [9]. Одним із найагресивніших патогенів пшениці називають *P.syringae* pv. *atrofaciens* - збудник базального бактеріозу зернових [9]. Патоген уражує всі частини рослин і зерно, може бути причиною його низької схожості, спричинює пустоколосистість, плямистість, гниль, що веде до втрат врожаю і зниження його якості [10]. До *P. syringae* pv. *atrofaciens* чутливе широке коло не тільки культурних рослин, таких як зернові, деякі бобові, пасльонові, а й навіть бур'яни та ще інші види рослин [185]. Слід зазначити, що рівень економічних збитків, які завдають бактеріальні захворювання пшениці, зокрема спричинені фітопатогенними псевдомонадами, є значною мірою недооціненим, оскільки у багатьох країнах ці фітопатогенні мікроорганізми лише почали з'являтися у структурі інфекційних агентів-збудників захворювань зернових. У таких країнах, як Аргентина, Австралія, Нова Зеландія, Італія, Пакистан, Іран, існують лише поодинокі повідомлення про появу *P. syringae* pv. *atrofaciens*. В агростатистичних даних з Бельгії, Ефіопії та Данії дані щодо хвороб зернових, спричинених цим фітопатогеном, взагалі відсутні [117]. Псевдомонади, у тому числі *P. syringae*, характеризуються високою стійкістю до протимікробних сполук [29], що спричиняє неефективність їх застосування у

контролі хвороб сільськогосподарських культур, спричинених цими фітопатогенами. Це актуалізує пошук агентів для біоконтролю цього фітопатогену. Перспективним напрямком пошуку агентів біоконтролю фітопатогенних мікроорганізмів є дослідження ендofітних угруповань. Загально визнано, що бактеріальні ендofітні спільноти присутні у всіх рослинах [186]. Зростаюча кількість досліджень ендofітних бактерій виявила, що вони відіграють важливу роль для всіх життєвих циклів рослини-хазяїна, є впливовими чинниками стресостійкості рослин, завдяки чому привертають за останні два десятиліття велику увагу науковців у галузі мікробіотехнології та агробіотехнології як перспективні об'єкти для створення рістстимулювальних препаратів та засобів біоконтролю захворювань сільськогосподарських рослин, у т.ч. й зернових [187,188]. Біотехнологічне використання ендofітів передбачає виділення культурабельних мікроорганізмів, поглиблене вивчення їх біологічних властивостей та пошук перспективних штамів для створення біотехнологічних продуктів.

З огляду на вище зазначене, було сформульовано робочу гіпотезу дисертаційного дослідження, яка полягала у тому, що стійкість пшениці до фітопатогенних псевдомонад може залежати від кількісних і функціональних характеристик зернових ендofітних бактеріальних угруповань, у складі яких не виключена присутність мікроорганізмів з антагоністичними властивостями щодо цього фітопатогену, пошук яких було поставлено за мету роботи. У відповідності до поставленої мети, дисертаційне дослідження проводили у декілька етапів. З огляду на те, що під негативний вплив патогену потрапляють рослини у різних фазах росту, однак, саме зерно є основним резервуаром збудника, ми спочатку вирішили дослідити вплив *P. syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978: УКМ В-1013 та його ЛПС на схожість зерна і ріст проростків для 13 різних сортів пшениці української та закордонної селекції. Цей патоген фітопатогенних псевдомонад вважається адаптованим до пшениці патогеном [9, 10]. На додачу до вивчення чутливості зерна різних сортів пшениці до *P. syringae* pv. *atrofaciens* ми провели аналогічне дослідження з використанням

неадаптованого до пшениці патовару фітопатогенних псевдомонад - *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та його ЛПС. Як зазначалося вище, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* виділено з уражених рослин вівса. У заражених збудником рослин з'являються на листках (рідше на володь, піхвах і лусочках квітів) світло-зелені плями (діаметром 6-7 мм), вдавнені в центрі. Пізніше плями розростаються, тканина цих плям в середині засихає і стає темно-коричневою, що пізніше чорніє або сіріє. Навколо таких плям формується ореол темно-зеленого або жовтуватого кольору (діаметром 0,7-3 см). Плями можуть зливатися. Іноді плямистість по краях листової пластинки розташовується у вигляді поздовжніх смужок. У суху сприятливу для збудника теплу погоду уражена тканина набуває коричневого забарвлення і засихає. Вона може мати також червоно-коричневий колір. *P. syringae* pv. *coronafaciens* паличкоподібна бактерія, палички зазвичай 0,65 x 2,3 мкм. Рухливі за допомогою одного або декількох полярних джгутиків. Бактрії на МПБ виробляють муть середньої інтенсивності з білою плівкою. Оксидазонегативні, утворюють полімер леван, продукують флуоресціюючий пігмент, мають капсулу. На МПБ колонії округлі, сірі, гладкі, зі слабо піднятими краями. Молоко згортають, желатин розріджують повільно, індол і NH₃ не утворюють. Бактерії здатні до утилізації сахарози, глюкози, левулозу з утворенням кислоти. Крохмаль гідролізують слабо. Оптимальна температура росту бактерій 26-28⁰С, мінімальна 13⁰С.

Включення до цього дослідження ЛПС було зумовлене його виключним значенням у механізмі фітопатогенної дії грамнегативних мікроорганізмів, у т.ч. й фітопатогенних псевдомонад. ЛПС є важливими компонентами зовнішньої мембрани бактерій роду *Pseudomonas*. ЛПС, які беруть участь у процесах патогенезу, надають бактеріям таких специфічних властивостей, як токсигенність та імуногенність, а також відіграють важливу роль у життєдіяльності бактерій. ЛПС підтримують структуру зовнішньої мембрани бактерій, беруть участь у регуляції її проникності, зумовлюють стійкість до антибіотиків, слугують рецепторами для бактеріофагів, а також відповідають за патогенність [189, 190]. У рослині-хазяїні ЛПС індукують синтез низки біоактивних медіаторів, у тому числі,

продуктів генів, що кодують чинники імунного захисту та антимікробних метаболітів [191]. Ін'єкція розчину ЛПС різних патоварів *P. syringae* під епідерміс листків капусти, тютюну, огірків, соняшників, гороху та томатів сприяє появі початкових симптомів захворювання, а в деяких випадках— некрозів і слабкої гіперплазії тканин. За результатами цього етапу досліджень нами було встановлено незначні відмінності у характері фітопатогенної дії адаптованого і неадаптованого до пшениці патоварів фітопатогенних псевдомонад: як живі клітини, так і ЛПС неадаптованого патовару більшою мірою негативно впливали на проростання зерна, але меншою мірою пригнічували ріст основного кореня проростків. Це дозволило нам припустити відмінності у механізмах стійкості до дії адаптованого і неадаптованого патогенів, які стали завданням наступного етапу роботи. Крім того, за результатами цього етапу досліджень з 13 використаних сортів пшениці нами було обрано три сорти для подальших досліджень: з високою (Фаворитка), помірною (Дискус) і низькою (Подолька) чутливістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013 та його ЛПС.

Відомо, що стійкість рослини до фітопатогенних мікроорганізмів реалізується на трьох основних рівнях: механічні чинники, які протидіють проникненню патогену, засоби неспецифічної резистентності та адаптивної резистентності [192]. Потужна неспецифічна резистентність рослини, важливими індукторами якої є мікроорганізми ендofітних угруповань, забезпечує їй стійкість не лише до адаптованих патогенів, а й до неадаптованих. Послідовність захисних реакцій рослини після розпізнавання молекулярних патернів патогенів передбачає активацію рецепторних кіназ, продукцію активних форм кисню (АФК), притік кальцію з наступною ініціацією дії мітоген активованих протеїнкіназ, кінцевим етапом цього алгоритму є активація транскрипції генів ефекторних молекул [193, 194]. АФК, як елемент імунного захисту рослинного організму, виконують дві функції: функцію сигнальних молекул у рецептор-опосередкованих молекулярних каскадах і бактерицидну функцію. Генерація значної кількості АФК та окиснювальні процеси, які ми спостерігаємо за накопиченням ТБК-активних сполук, можуть бути необхідною ланкою механізму захисту рослинного організму.

Зокрема, накопичення H_2O_2 у сублетальних кількостях може сприяти активації експресії PR-білків (pathogenesis-related proteins) [195]. Крім того, акумуляція АФК призводить до окиснювального вибуху, що є складовою реакції гіперчутливості – загальної реакції клітин рослини-хазяїна на інвазію патогену. Окиснювальний вибух може призводити до розвитку некрозів, що сприяє загибелі фітопатогенів [196]. Разом з тим, АФК, зокрема, H_2O_2 , необхідні для функціонування пероксидаз клітинної стінки. Так, пероксидази каталізують реакцію полімеризації фенольних сполук для утворення лігніну. Окрім того, пероксидази забезпечують утворення міжмолекулярних зв'язків між молекулами екстенсину – білка клітинної стінки [197]. Надмірна генерація АФК спричиняє їх взаємодію з білками, ліпідами і ДНК, наслідком чого можуть бути метаболічні розлади, деструкція клітинних мембран і клітинна загибель. Захист рослини від руйнівної дії АФК забезпечують ензими антиоксидантного захисту. Збалансованість роботи оксидантно-антиоксидантної системи є одним з найважливіших елементів стійкості рослин до фітопатогенів [198]. Система антиоксидантного захисту рослинних клітин включає ензиматичні та неензиматичні компоненти [199]. Серед ензиматичних компонентів важливе значення мають СОД та КАТ. СОД є первинною ланкою у знешкодженні високореакційноздатних супероксидних аніон-радикалів ($O\bullet-2$). Вона знешкоджує їх з утворенням більш стабільних та здатних до переміщення у гідрофільному внутрішньоклітинному середовищі молекул пероксиду водню. $O\bullet-2$ є джерелом формування більш реакційноздатних АФК, таких як пероксид водню, пероксинітрил, гідроксильні, гідроксиперекисні радикали, синглетний кисень. Відсутність специфічних ензимів для детоксикації цих сполук, здатних активно окиснювати білкові молекули, надає СОД виключної ролі в антиоксидантному захисті [200]. КАТ – партнер СОД у системі антиоксидантного захисту. КАТ каталізує дисмутацію цитотоксичного пероксиду водню, утвореного за дії СОД, на H_2O та O_2 . Послаблення активності КАТ асоціюється з накопиченням пероксиду водню і посиленням його цитотоксичної дії [149]. Дослідження стану оксидантно-антиоксидантної системи у проростках пшениці різних сортів за умов експозиції живими клітинами та ЛПС адаптованого та неадаптованого патоварів

фітопатогенних псевдомонад показало лише незначні відмінності у реакції рослини на використанні патовари. Натомість оксидантно-антиоксидантний баланс істотно відрізнявся у сортів пшениці з різною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад. Висока чутливість до збудника була асоційована з підвищенням вмісту ТБК у тканинах проростків (оксидативним стресом), відсутністю істотного підвищення активності СОД у сукупності з підвищенням активності КАТ у відповідь на експозицію патогеном. Слід зазначити, що рівень ТБК у тканинах необроблених фітопатогеном проростків був найвищим у сорту Фаворитки з низькою чутливістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013. Високий вміст АФК у тканинах у відсутності дії стресорів може підтримуватися за рахунок стимуляції їх синтезу симбіотичними мікроорганізмами [202]. Це свідчить на користь висунутого нами припущення щодо залежності стійкості до фітопатогенних бактерій від кількісних і функціональних характеристик ендofітного угруповання, одним з механізмів якого може бути підтримка балансу оксидантно-антиоксидантної системи. Крім того, отримані нами дані дозволяють зробити припущення про те, що незбалансована робота партнерських ферментів антиоксидантного захисту є одним з механізмів високої чутливості до патогену. Цікаві результати було отримано стосовно концентрації проліну у тканинах проростків за умов експозиції патогенами та їх ЛПС. Процес адаптації рослин до несприятливих умов зовнішнього середовища можна умовно розділити на дві основні стадії: стрес-реакцію і власне адаптацію, які вирішують різні біологічні завдання за рахунок функціонування відповідних захисних і адаптивних механізмів. Вважають, що амінокислота пролін є одним із компонентів реакції рослин на дію осмотичного стресу. Про це свідчить висока швидкість акумуляції проліну у відповідь на дію екстремальних чинників і відсутність специфічності цього процесу до природи чинника [202]. Водночас цей метаболіт є важливим елементом захисної системи рослин. Встановлено, що вільний пролін виявляє осморегуляторні, антиоксидантні, енергетичні та інші функції, які спрямовані на підтримання клітинного гомеостазу і стабілізацію мембран за умов стресу у процесі адаптації [203]. Показано також, що пролін стабілізує молекули білків. Він добре розчиняється у воді, утворюючи

колоїдні полімерні структури, що запобігає денатурації білкових молекул та сприяє збереженню їх нативної конформації за умов стресу. Хоча пролін, імовірно, одна з найпоширеніших осмотично активних речовин у вищих рослин, однак усі його можливі функції за стресових умов остаточно не з'ясовані. У наших дослідженнях висока чутливість до фітопатогену та їх ЛПС у сорту Фаворитка була асоційована з різким зростанням вмісту проліну. Слід, однак, відмітити, що конститутивна (у тканинах необроблених проростків) концентрація проліну була майже на порядок нижчою у цього сорту порівняно з більш стійкими сортами. Пролін є важливим субстратом для генерації АФК, які утворюються в результаті його окиснення проліндегідрогеназою [156]. З іншого боку, пролін може слугувати для знешкодження АФК [155]. Це дозволяє зробити припущення про те, що підвищений вміст проліну у стійких сортів міг бути використаний рослиною для нейтралізації АФК і мінімізації оксидативного стресу та симптоматичних проявів хвороби. При цьому у чутливого сорту накопичення проліну могло слугувати для генерації АФК і захисту від патогену. Однак, у відсутності адекватного функціонування антиоксидантних чинників це спричинило симптоматику інфекційної хвороби.

Наступна частина роботи була присвячена виділенню ендofітних бактерій з сортів зерна пшениці з різною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад та порівняльній оцінці їх кількісних і функціональних характеристик. Результати цієї частини роботи дозволили встановити, що загальна кількість ендofітних мікроорганізмів у зерні значно вища у сортів з високою стійкістю до *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В- 1013.

Отримані нами дані дозволяють встановити кількісну межу ендofітних бактерій, асоційовану з високою стійкістю до фітопатогену, оскільки у сорту Фаворика з найнижчою стійкістю загальна кількість зернових культурабельних ендofітних бактерій була на порядок нижчою, ніж у сорту Подолянка з найвищою стійкістю і на два порядки – порівняно з сортом Діскус з помірною стійкістю. Висока стійкість до *P. syringae* pv. *atropaciens* була асоційована з переважанням у

складі ендofітних угруповань споротвірних бацил та/або грамнегативних бактерій, але не грампозитивних коків (рис.4.1).

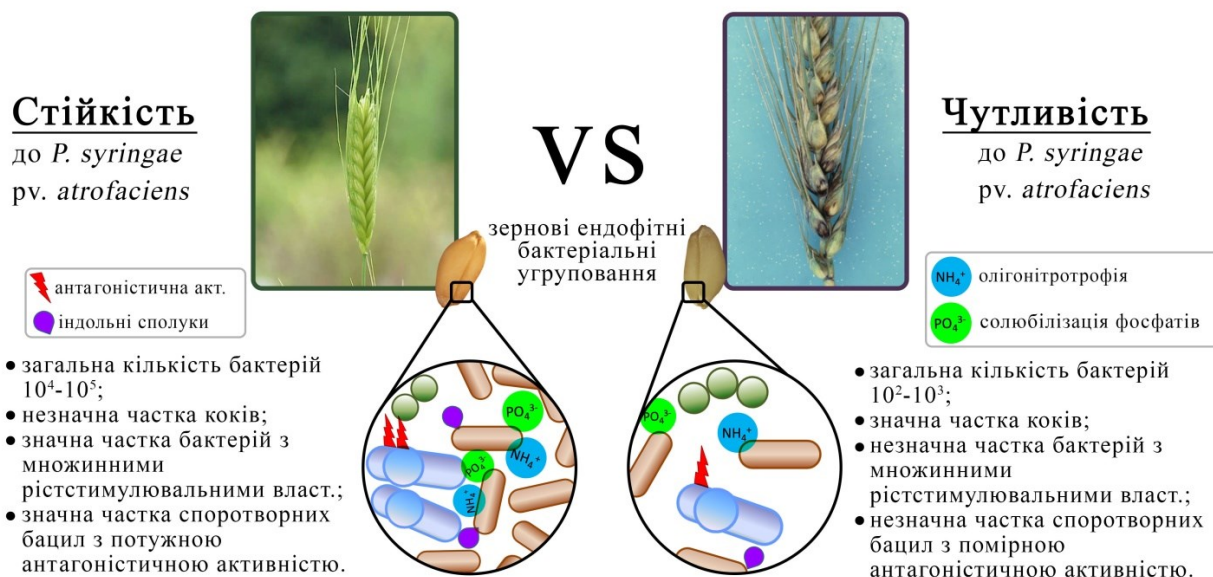


Рисунок 4.1. Схематична репрезентація асоціації кількісних і функціональних характеристик зернового бактеріального ендofітного угруповання зі стійкістю пшениці до *Pseudomonas syringae* *pv. atrofaciens*.

Наступною відмінною рисою зернового ендofітного бактеріального угруповання у сорту пшениці, найбільш стійкого до фітопатогенних псевдомонад, була присутність у його складі найвищої частки мікроорганізмів, які володіли одночасно трьома фізіологічними властивостями, корисними для стимуляції росту рослини-хазяїна: здатністю рости на безазотному поживному середовищі (олігонітродотрофією), здатністю солюбілізувати фосфати та здатністю продукувати індольні сполуки, які належать до гетерогенних ауксинів – гормонів росту рослин. При цьому слід зазначити, що у складі ендofітів сортів пшениці з підвищеною стійкістю до *P. syringae* *pv. atrofaciens* були присутні мікроорганізми, для яких були одночасно властиві солюбілізація фосфатів і синтез індольних сполук, олігонітродотрофія і здатність солюбілізувати фосфати. Бактерії з такими властивостями були відсутні у складі ендofітів високо чутливого сорту пшениці Фаворитка. Натомість, у сорту Фаворитка були присутні представники ендofітних

бактерій з одночасною здатністю рости на безазотному поживному середовищі у поєднанні зі здатністю синтезувати індольні сполуки, які не виявлялися в ендоефітному угрупованні більш стійких сортів.

Серед бактерій ендоефітів кожного сорту пшениці було виявлено мікроорганізми з антагоністичною активністю щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 – загальною кількістю 5 ізолятів: по 2 з сортів з підвищеною стійкістю (Р6 і Р10 та D2 і D5 відповідно) і 1 (F1) – з сорту з низькою стійкістю. Найвища частка зернових ендоефітів з антагоністичною активністю була нами зареєстрована в угрупованні сорту з найвищою чутливістю до *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013. Ізолят з найбільш виразною антагоністичною активністю (Р6) також був виявлений у складі саме цього ендоефітного угруповання. На останньому етапі роботи проводили ідентифікацію виділених зернових ендоефітних ізолятів із застосуванням біохімічних, фізико-хімічних та молекулярно-біологічних методичних підходів. За біохімічним профілем, мас-спектром та результатами секвенування гена 16S рРНК виділені нами ізоляти зернових ендоефітних бактерій з антагоністичною активністю щодо *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1013 були віднесені до споротвірних бацил: F1 і D2 – групи *B. subtilis*, D5 - *Bacillus pumilus*, Р6 - *Paenibacillus polymyxa* і Р10 – *Brevibacillus brevis*. Однак, високий ступінь спорідненості гена 16S рРНК для бацил різних видів в межах роду або групи зумовлює необхідність уточнення філогенетичних характеристик виділених нами ендоефітних бактерій у подальших дослідженнях. Фізіологічні характеристики виділених та ідентифікованих нами ізолятів зернових ендоефітних бактерій загалом узгоджуються з даними літератури. Зокрема повідомляється, що бактеріям роду *Paenibacillus* притаманна одночасна здатність до олігонітротрофії, солубілізації фосфатів і синтезу гетероауксинів, яка поєднується з широкоспектровою антагоністичною активністю [165, 166, 167, 169]. Антагоністичні та рістстимулювальні властивості описані в літературі і для решти виділених нами та ідентифікованих ендоефітних бактерій зерна [170, 174, 177]. Однак, на нашу думку, найбільш перспективним для подальших досліджень з точки зору застосування у

агробіотехнології є ізолят Р6, ідентифікований як *Paenibacillus polytuxa*, з антагоністичною та множинними рістстимулювальними властивостями.

Отримані нами дані порівняльного дослідження бактеріальних ендوفітів пшениці з метою пошуку мікроорганізмів з антагоністичною активністю щодо фітопатогенних псевдомонад дають підстави вважати, що такий пошук варто зосередити на сортах з високою стійкістю, де можна очікувати присутність найбільш симбіотично потужних мікроорганізмів. Не виключено, що ендوفітні бактерії з антагоністичною активністю в умовах *in planta* можуть чинити синергічну і більш виразну антагоністичну дію у консорціумі, ніж застосовані поодиночі. Однак, висловлене припущення вимагає додаткових подальших досліджень.

Висновки

За результатами дисертаційного дослідження розширено існуючі уявлення щодо різноманітності ендofітних бактерій зерна пшениці. Встановлено взаємозв'язок між кількісними та функціональними характеристиками зернових ендofітних бактерій та стійкістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Виділено штами-антагоністи ендofітних бактерій з множинними ріст-стимулювальними властивостями, які можуть бути перспективними об'єктами для розробки агробіотехнологічних препаратів стимуляції росту рослин і біозахисту від фітопатогенних бактерій.

1. Показано, що стійкість зерна пшениці до живих клітин та ЛПС адаптованого та неадаптованого патоварів *P. syringae* не є абсолютно ідентичною і за деякими характеристиками (більш виразним негативним впливом живих клітин адаптованого патовару на ріст основного кореня проростків) відрізняється, що може вказувати на відмінності у механізмах резистентності.

2. Загальна кількість культурабельних ендofітних бактерій сортів пшениці, стійких до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013, більше, ніж на порядок, перевищує аналогічний показник для сорту Фаворитка, чутливого до фітопатогену. Серед морфотипів бактеріальних ендofітів переважають грамнегативні палички та/або споротвірні бацили.

3. У складі ендofітних мікробних угруповань сорту пшениці Подолянка з високою стійкістю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013 зареєстровано найбільшу частку (37,5%) бактерій, що володіють одночасно трьома рістстимулювальними властивостями: олігонітротрофністю, фосфатсолюбілізуючою здатністю і продукцією індольних сполук.

4. Частка ендofітних бактерій з антагоністичною активністю до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В- 1013 склала 6% (1 ізолят, F1) у сорту пшениці Фаворитка з низькою стійкістю до фітопатогену, 39% (2 ізоляти, D2 та D5) та 20% (2 ізоляти, P6 та P10) у сортів з помірною стійкістю Діскус та високою Подолянка.

Найвищу антагоністичну активність зареєстровано в ендofітних бактерій зі стійкого сорту Подолянка (діаметр зони затримки росту 23- 27 мм). Ізоляти ендofітних бактерій з антагоністичною активністю ідентифіковані за біохімічним профілем, мас-спектром та результатами секвенування гена 16S рРНК як *Bacillus* spp. (D2, F1) –*Brevibacillus brevis* (P10), та *Paenibacillus polymyxa* (P6) та *Bacillus pumilus* (D5).

5. Встановлено, що підвищена чутливість пшениці до *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В- 1013 асоційована зі зниженим (на 45% порівняно з показником стійких сортів) базальним рівнем ТБК-активних сполук, зниженою (на 40% порівняно зі стійкими сортами) спонтанною активністю каталази, підвищеною (в 1,9 рази) спонтанною активністю супероксиддисмутази, зниженим (у 4 рази) конститутивним вмістом проліну і різким (у 20 разів) збільшенням його концентрації після обробки патогеном.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Verma, S.K., Sahu, P.K., Kumar, K., Pal, G., Gond, S.K., Kharwar, R.N., & White, J.F. (2020). Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance. *J Appl Microbiol*, 131(5):2161-2177. <https://doi.org/10.1111/jam.15111>.
2. Lata, R., Chowdhury, S., Gond S.K., & White, J.F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett Appl Microbiol*, 66(4):268-276. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>.
3. Rana, K.L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A.N., Yadav, N., Dhaliwal, H.S., & Saxena, A.K. (2020). Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(8):1075-1107. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429>.
4. Ali, M., Ali, Q., Sohail, M.A., Ashraf, M.F., Saleem, M.H., Hussain, S. & Zhou, L. (2021). Diversity and Taxonomic Distribution of Endophytic Bacterial Community in the Rice Plant and Its Prospective. *Int J Mol Sci*, 22(18):10165. <https://doi.org/10.3390/ijms221810165>.
5. Oukala, N., Aissat, K., & Pastor, V. (2021). Bacterial Endophytes: The Hidden Actor in Plant Immune Responses against Biotic Stress. *Plants (Basel)*, 10(5):1012. <https://doi.org/10.3390/plants10051012>.
6. Huang, X., Ren, J., Li, P., Feng, S., Dong, P., & Ren, M. (2021). Potential of microbial endophytes to enhance the resistance to postharvest diseases of fruit and vegetables. *J Sci Food Agric*. 101(5):1744-1757. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10829>.
7. Chouhan, G.K., Verma, J.P., Jaiswal, D.K., Mukherjee, A., Singh, S., de Araujo Pereira, A.P., Liu, H., Abd Allah, E.F., & Singh, B.K. (2021). Phytomicrobiome for promoting sustainable agriculture and food security: Opportunities, challenges,

- and solutions. *Microbiol Res.* 248:126763. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126763>.
8. Kuźniar, A., Włodarczyk, K., Grządziel, J., Woźniak, M., Furtak, K., Gałązka, A., Dziadczyk, E., Skórzyńska-Polit, E. & Wolińska, A (2020). New Insight into the Composition of Wheat Seed Microbiota. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4634. <https://doi.org/10.3390/ijms21134634>.
 9. Lamichhane, J.R., Messe'an, A., & Morris, C.E. (2015). Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *J Gen Plant Pathol*, 81, 331–350. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0605-z>.
 10. Пасичник, Л. А., Савенко, Е. А., Буценко, Л. Н., Патыка, В. Ф., & Калиниченко, А. В. (2014). *Pseudomonas syringae* в агрофитоценозе пшеницы. *Наука и мир. Международный научный журнал*, 4 (8). 52–56.
 11. Гвоздяк, Р.И., Пасичник, Л.А., & Яковлева, Л.М. (2021). Фитопатогенные бактерии. Бактериальные болезни растений: Монография – К.: ТОВ «НВП «Интерсервис», 58. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134449](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134449).
 12. Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H-J., & Duveiller, E. (2013) Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, 5(3), 291-317. <https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y>.
 13. Muthukumar, A., Regunathan, U., & Ramasamy, N. (2017) Role of Bacterial Endophytes in Plant Disease Control. In: Maheshwari, D.K., Annapurna, K. (Eds) *Endophytes: Crop Productivity and Protection*, v.2, Springer International Publishing AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-66544-3>.
 14. Ryabchenko, O., & Nonhebel, S. (2016). Assessing wheat production futures in the Ukraine. *Outlook on Agriculture*, 45(3), 165–172. <https://doi.org/10.1177/0030727016664159>.

15. Бушулян, М. А. (2015). Характеристика сортів пшениці озимої селекції за показниками, що зумовлюють стійкість-сприйнятливість до *Septoria tritici* в Степу України. Насінництво, 1 (144): 1–2.
16. Singh, R.P., Singh, P.K., Rutkoski, J., Hodson, D.P., He, X., Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., & Huerta-Espino, J. (2016) Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 13.1–13.20. <https://doi/10.1146/annurev-phyto-080615-095835>.
17. Kazempour, M., Kheyrghoo, M., Pedramfar, H., & Rahimian, H. (2010) Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *African Journal of Biotechnology*, 9, 2860–2865. <https://doi.org/10.5897/AJB2010.000-3113>.
18. Valencia-Botín, A. J., & Cisneros-López M E. (2012) A Review of the Studies and Interactions of *Pseudomonas syringae* Pathovars on Wheat. *International Journal of Agronomy*, 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/692350>
19. Буценко, Л.М., Пасічник, Л.А., Калініченко, А.В., & Пати́ка, В.П. (2019). Діагностика і контроль збудників бактеріальних хвороб пшениці. Методичні рекомендації. К.: ФОП ЯМЧИНСЬКИЙ, 37.
20. Pasichnik, L.A., Patyka, V.F., Khodos, S.F., & Vinnichuk, T.S. (2017). Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread. *Mikrobiol. Zhur.* 74(4). – P.37-44.
21. Sapkota, S., Mergoum, M., & Liu, Z. (2020). Group of translucens *Xanthomonas translucens*: complex and important pathogens causing bacterial leaf streak on cereals. *Like. Patol plant.* 21: 291 -302.
22. Jones, L.R., Johnson, A.G. & Reddy, C.S. (1917). Bacterial burn of barley. *J. Agricul. Res.*, 11: 625-643.
23. Smith, E.F., Jones, L.R. & Reddy, C.S. (1919). Black chaff of wheat. *Science*: 50: 48.

24. Bragard, C., Verdier, B. and Maraite, H. (1995). Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* strains pathogenic for small grain. *Adj. Environ. Microb.* 61: 020 – 1026.
25. Kazempour, M. N., Kheyrghoo, M., Pedramfar, H., & Rahimian, H. (2010). Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *Afr. J. Biotechnol.*, 9(20), 2866–2871.
<https://doi.org/10.5897/AJB2010.000-3113>.
26. Otta, J. D. (1974). *Pseudomonas syringae* incites a leaf necrosis on spring and winter wheats in South Dakota. *Plant Dis. Rep.*, 58(12), 1061–1064.
27. Mavridis, A., Meyer, D., Mielke, H., & Steinkampf, G. (1991). Zum Auftreten und zur Schadwirkung der basalen Spelzenfäule beim Sommerweizen. *Kali-Briefe (Büntehof)*, 20, 469–473.
28. Kotlyarov, V. V. (2008). *Bacterial Diseases of Cultivated Plants*. Krasnodar: KubGAU.
29. Valencia-Botín, A. J., Cisneros-López M. E. A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *International Journal of Agronomy*. 2012. Vol. 2012. Article ID 692350, 5 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/692350>.
30. Pastoshchuk, A.Yu., Skivka, L.M., Butsenko, L.M., & Patyka, V.P. (2018). Effect of causal agent of basal bacteriosis on seed germination and rood growth of different wheat varieties. *Microbiology&Biotechnology*. 2(42):39-48.
[https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134449](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134449).
31. Пасічник, Л. А. (2000). Антигенні властивості бактерій патоварів *Pseudomonas syringae*, які уражують зернові культури. *Мікробіологічний журнал*. Т. 62, № 5. 18–22.

32. Ткачева, Л.Б. (2005). Биологический фунгицид и бактерицид бактофит. В: Второй Всероссийский съезд по защите растений "Фитосанитарное оздоровление экосистем". Санкт-Петербург. 2. 563–564.
33. Котляров, В.В., Дьяченко, А.А., & Котляров, Д., В. (2005). Влияние бактериозов на качество зерна озимой пшеницы. Защита растений. (12):25–26.
34. Slusarenko, A.J., Fraser R.S.S., & van Loon LC eds. (2000) Systemic induced resistance. In: Mechanisms of resistance to plant diseases Kluwer: Dordrecht, pp 521–574.
35. Choudhary, D.K., Prakash, A., Johri, B.N. (2007)/Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. Indian J Microbiol. 47(4):289-297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
36. Ádám, A. L., Nagy, Z. Á., Kátay, G., Mergenthaler, E., & Viczián, O. (2018). Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1146. <https://doi.org/10.3390/ijms19041146>.
37. Annapurna, K., Kumar A., Kumar L.V., Govindasamy V., & Bose P., Ramadoss D. (2013) PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management. In: Maheshwari D. (eds) Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_15.
38. Pieterse, C.M.J., Ton, J & van Loon, L.C., (2001). Cross-talk between plant defence signalong pathways: boost or burden? Agri Biotech Net 3:1–18.
39. Yan, Z., Reddy, M.S, Ryu, C.M., Mc Inroy, J.A., Wilson, M & Kloepper, J.W. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by PGPR. *Phytopathol* 92: 1329–1333. [1007/s12088-007-0054-2](https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2).
40. Gómez-Gómez, L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol Immunol* 41:1055–1062.

41. Erbs, G. & Newmann, M.A. (2003). The role of lipopolysaccharides in induction of plant defense responses. *Mol Plant Pathol* 4:421–425.
42. Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 7:547–552.
43. Dai, Z.C., Fu, W., & Wan, L.Y. (2016). Different Growth Promoting Effects of Endophytic Bacteria on Invasive and Native Clonal Plants. *Front Plant Sci*, 7:706. Published, 24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00706>.
44. Bokhari, A., Essack, M., & Lafi, F.F. (2020). Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance [published correction appears in *Sci Rep*, 10(1):3001]. *Sci Rep*. 2019;9(1):18154. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685>.
45. Lopes, R., Tsui, S., Gonçalves, P.J., & de Queiroz M.V. (2018). A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 34(7):94. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2479-7>.
46. Xia, C., Li, N., Zhang, Y., Li, C., Zhang X, & Nan, Z. (2018). Role of *Epichloë* Endophytes in Defense Responses of Cool-Season Grasses to Pathogens: A Review. *Plant Dis*, 102(11):2061-2073. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0762>.
47. White, J.F., Kingsley, K.L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S, Elmore M.T., Verma, S.K., Gond, S, K., & Kowalski, K,P. (2019). Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Manag Sci*. 75(10):2558-2565. <https://doi.org/10.1002/ps.5527>.
48. Fadiji, A.E., & Babalola, O.O. (2020). Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects. *Front Bioeng Biotechnol*, 15;8:467. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00467>.
49. Stael, S., Kmiecik, P., Willems, P., Van Der Kelen, K., Coll, N.S., Teige, M., & Van Breusegem, F. (2015). Plant innate immunity--sunny side up? *Trends Plant Sci*, 20(1):3-11. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>.

50. Chassot, C., Nawrath, C., & Métraux, J.P. (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen, 49(6):972-80. [https://doi.org 10.1111/j.1365-313X.2006.03017.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03017.x).
51. Abdul Malik, N.A., Kumar, I.S., & Nadarajah, K. (2020). Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *Int J Mol Sci*, 21(3):963. [https://doi.org 10.3390/ijms21030963](https://doi.org/10.3390/ijms21030963).
52. Saijo, Y., Loo, E.P., & Yasuda, S. (2018). Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant*, 93(4):592-613. [https://doi.org 10.1111/tpj.13808](https://doi.org/10.1111/tpj.13808).
53. Wang, J.W., Wu, J.Y. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013;134:55-89. [https://doi.org10.1007/10_2013_183](https://doi.org/10.1007/10_2013_183).
54. Chakraborty, N., Ghosh, S., Chandra, S., Sengupta, S., & Acharya, K. (2016). Abiotic elicitors mediated elicitation of innate immunity in tomato: an ex vivo comparison. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, 22(3), 307–320. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0373-z>.
55. Desaki, Y., Miya, A., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Yamane, H., Kaku, H., Minami, E., & Shibuya, N. (2006). Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol*, 47(11):1530-40. [https://doi.org 10.1093/pcp/pcl019](https://doi.org/10.1093/pcp/pcl019).
56. Nürnberger, T., Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol*, 6(3):335-45. [https://doi.org 10.1111/j.1364-3703.2005.00279.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00279.x).
57. Silipo, A., Ierano, T., Lanzetta, R., Molinaro, A., Parrilli, M. (2008). The structure of the O-chain polysaccharide from the gram-negative endophytic bacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Eur J Org Chem*, 2303-8. <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.200800135>.

58. Jayaraman, J., Jones, W.T., Harvey, D., Hemara, L.M., McCann, H.C., Yoon, M., Warring, S.L., Fineran, P.C., Mesarich, C.H., & Templeton, M.D. (2020). Variation at the common polysaccharide antigen locus drives lipopolysaccharide diversity within the *Pseudomonas syringae* species complex. *Environ Microbiol*, 22(12):5356-5372. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15250>.
59. Zhang, J., & Zhou, J.M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol Plant*, 3:783-93. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssq035>.
60. Erbs, G., & Newman, M.A. (2012). The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Mol Plant Pathol*, 13:95-10421.; PMID:21726397. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00730.x>.
61. Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., & Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 101:15811-6; PMID:15498873; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404536101>.
62. Gerber, I.B., & Dubery, I.A. (2004). Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochem*, 65:2957-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.09.005>.
63. Sanabria, N.M., & Dubery, I.A. (2006). Differential display profiling of the *Nicotiana* response to LPS reveals elements of plant basal resistance. *Biochem Biophys Res Com*, 344:1001-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.216>.
64. Madala, N.E., Molinaro, A., & Dubery, I.A. (2012). Distinct carbohydrate and lipid-based molecular patterns within lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to defense-associated differential gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Innate Immun*, 18:140-54. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425910392609>

65. Landeo Villanueva, S., Malvestiti, M.C., van Ieperen, W., Joosten, MHAJ., & van Kan, JAL. (2021). Red light imaging for programmed cell death visualization and quantification in plant-pathogen interactions. *Mol Plant Pathol*, 22(3):361-372. <https://doi.org/10.1111/mpp.13027>
66. Cubría-Radio, M., & Nowack, M.K. (2019). Transcriptional networks orchestrating programmed cell death during plant development. *Curr Top Dev Biol*, 131:161-184. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.10.006>.
67. Newman, M.A., Dow, J.M., Molinaro, A., & Parrilli, M. (2007). Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res*, 13(2):69-84. <https://doi.org/10.1177/0968051907079399>.
68. Newman, D.J., & Cragg, G.M. (2020). Plant Endophytes and Epiphytes: Burgeoning Sources of Known and "Unknown" Cytotoxic and Antibiotic Agents? *Planta Med*, 86(13-14):891-905. <https://doi.org/10.1055/a-1095-1111>.
69. Schlechter, R.O., Miebach, M., & Remus-Emsermann, M.N.P. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: A review. *J Adv Res*, 14;19:57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.003>.
70. Laforest-Lapointe, I., Messier, C., Kembel, S.W. (2017). Tree Leaf Bacterial Community Structure and Diversity Differ along a Gradient of Urban Intensity. *MSystems*, 5;2(6):e00087-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00087-17>.
71. Tsialtas, J.T., & Maslari, N. (2008). Leaf area prediction model for sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars. *Photosynthetica*, 46(2), 291-293. <https://doi:10.1007/s11099-008-0051-7>.
72. Leontievskaya, E.A., & Dobrovol'skaya, T.G. (2014). Epiphytic bacterial complexes in grain crops: Taxonomic composition and antagonistic properties. *EurasianSoilSc.* 47, 1033–1037. <https://doi.org/10.1134/S1064229314100068>.

73. Ворхолт, Дж. А. (2012). Мікробне життя у філосфері. Огляди природи. Мікробіологія, № 10. С. 829–840. [https://doi.org/10,1038 / nrmicro2910](https://doi.org/10.1038/nrmicro2910).
74. Chen, C., Xin, K., Liu, H., Cheng, J., Shen, X., Wang, Y., & Zhang, L. (2017). *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. *Scientificreports*, 7,41564. <https://doi.org/10.1038/srep41564>.
75. Günter, Brader., Stéphane, Compant, Kathryn Vescio, Birgit Mitter, Friederike Trognitz, Li-Jun Ma, & Angela Sessitsch. (2017). Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55:1, 61-83. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>.
76. Vandana, U.K, Rajkumari, J., Singha, L.P., Satish, L., Alavilli, H., Chauhan, S., Ratnala, R., Satturu, V., Mazumder, P.B., & Pandey, P. (2021). The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. *Biology (Basel)*, 10(2):101. <https://doi.org/10.3390/biology10020101>.
77. Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse CMJ., & Schenk, P.M. (2017). Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Front Microbiol*, 8:2552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>.
78. Agarwal, P., Giri, B.S., & Rani, R. (2020). Unravelling the Role of Rhizospheric Plant-Microbe Synergy in Phytoremediation: A Genomic Perspective. *Curr Genomics*, 21(5):334-342. <https://doi.org/10.2174/1389202921999200623133240>.
79. Strakowska, J., Błaszczuk, L., & Chełkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *J Basic Microbiol*, 54 Suppl 1:S2-13. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300821>.

80. Tsai, A.Y., Oota, M., & Sawa, S. Chemotactic Host-Finding Strategies of Plant Endoparasites and Endophytes. *Front Plant Sci.* 2020 Jul 31;11:1167.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01167>.
81. Ibáñez, F., Wall, L., & Fabra, A. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *J Exp Bot.* 2017 Apr 1;68(8):1905-1918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw387>.
82. Mookherjee, A., Singh, S., & Maiti, M.K. (2018). Quorum sensing inhibitors: can endophytes be prospective sources? *Arch Microbiol.* 200(2):355-369.
<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1437-3>.
83. Favre-Godal, Q., Gourguillon, L., Lordel-Madeleine, S., Gindro, K., & Choisy, P. (2020). Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza.* 30(1):5-22.
<https://doi.org/10.1007/s00572-020-00934-2>.
84. Frank, A.C., Saldierna Guzmán, J.P., & Shay J.E. (2017). Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms*, 5(4):70.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>.
85. Taulé, C., Vaz-Jauri, P., & Battistoni, F. (2021). Insights into the early stages of plant-endophytic bacteria interaction. *World J Microbiol Biotechnol*, 37(1):13.
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02966-4>.
86. Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2021). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol*, 62(1):188-97.
<https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>.
87. Knapp, D.G., Németh, J.B., Barry, K., Hainaut, M., Henrissat, B., Johnson, J., Kuo, A., & Lim, J.H. (2018). Comparative genomics provides insights into the lifestyle

- and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Sci Rep*, 8(1):6321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24686-4>.
88. Powell, R.G. (2009). Plant seeds as sources of potential industrial chemicals, pharmaceuticals, and pest control agents. *J Nat Prod*. 72(3):516-23. <https://doi.org/10.1021/np8006217>.
89. Ling, L., Tu, Y., Ma, W., Feng, S., Yang, C., Zhao, Y., Wang, N., Li, Z., Lu, L., & Zhang, J. A. (2020). Potentially important resource: endophytic yeasts. *World J Microbiol Biotechnol*, 36(8):110. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02889-0>.
90. Yuan, Z., Tian, Y., He, F., & Zhou, H. (2019). Endophytes from *Ginkgo biloba* and their secondary metabolites. *Chin Med*, 14:51. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0271-8>.
91. Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C., & Baillieul, F. (2017) Screening of wheat endophytes as biological control agents against Fusarium head blight using two different in vitro tests. *Microbiol Res*. 202, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.014>.
92. Rana, K.L., Kour, D., Kaur, T., Sheikh, I., Yadav, A. N., Kumar, V., Suman A., & Dhaliwal, H. S. (2020). Endophytic Microbes from Diverse Wheat Genotypes and Their Potential Biotechnological Applications in Plant Growth Promotion and Nutrient Uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 1-11. <https://doi.org/10.1007/s40011-020-01168-0>.
93. Robinson, R.J., Fraaije, B.A, Clark, I.M., Jackson, R.W., Hirsch, P.R., & Mauchline, T.H. (2016). Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant Soil*, 45, 381–396.
94. Shahzad, R., Khan, A.L., Bilal, S., Asaf, S., & Lee, Y.J. (2018). What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front. Plant Sci*, 9, 24.

95. Shade, A., Jacques, M.A., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol*, 37, 15–22.
96. Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2014). Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep*, 7, 1–11.
97. Nelson, E.B., Simoneau, P., Barret, M., Mitter, B., & Compant, S. (2018). Editorial special issue: The soil, the seed, the microbes and the plant. *Plant Soil*, 422, 1–5.
98. Geisen, S., Kostenko, O., Cnossen, M.C., ten Hooven, F.C., Vres, B., & van der Putten, W.H. (2017). Seed and root endophytic fungi in a range expanding and a related plant species. *Front. Microbiol*, 8, 1645.
99. Kuz'niar, A., Włodarczyk, K., Grza̧dziel, J., Goraj, W., Gała̧zka, A., & Wolin'ska, A. (2020a) Culture independent analysis of an endophytic core microbiome in two species of wheat: *Triticum aestivum* L. (cv. 'Hondia') and the first report of microbiota in *Triticum spelta* L. (cv. 'Rokosz'). *Syst. Appl. Microbiol.* 43, 126025. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126025>.
100. Гвоздяк, Р. І., Кабашна, Л. В., Пасічник, Л. А., & Макарчук, Є. А. (2001). Ендофітна мікрофлора зерна пшениці та її взаємодія з фітопатогенними бактеріями. *Доп. НАН України*, № 1. С.173–177
101. Пасічник, Л.А., Гвоздяк, Р.І., Козировська Н.О. та ін. Проникнення *Pantoea agglomerans* в коріння пшениці. *Х з'їзд Товариства мікробіологів України (Одеса, вересень 2004 р.)*. Тези доп. Одеса, "Астропринт", 2004, С. 295.
102. Penistacia, Mehabo Maela & Mahloro Hope, Serepa-Dlamini Current. (2019). Understanding of Bacterial Endophytes, Their Diversity, Colonization and Their Roles in Promoting Plant Growth. *Appl. Microbiol*, 5:1. <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000157>.

103. Bushra, Khanam, Ramesh, Chandra (2015). Isolation and identification of endofitic bacteria producing bright red pigment from the dye yielding plant *BetaVulgaris* L , International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Vol 7, Issue 5, 2015.
104. Rashid, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growthpromoting bacterial endophyte. *Applied Soil Ecology*,61:217–224.
105. Kaur, R., Mainam, A., & Vyas, P. (2017). Endophytic *Pseudomonas* sp. TCA1 from *Tinospora cordifolia* stem with antagonistic and plant growth-promoting potential. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 10(2):456–460.
106. Park, K. H., Lee, C. Y., & Son, H. J. (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Letters in Applied Microbiology*. 49(2):222–228.
107. Patel, D. K., Archana, G., Kumar, G. N. (2008). Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Current Microbiology*. 56(2):168–174.
108. Goggin, D.E., Emery, R.J., Kurepin, L.V., & Powles, S.B. (2015). A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Loliumrigidum* seeds. *Ann. Bot*, 115, 293–30.
109. Демчинська, М., І. (2006). Ендофітна мікрофлора культури тканин картоплі Сільськогосподарська мікробіологія. Вип. 3/123–134.
110. Гвоздяк Р. І., Черненко Є. П., Мороз С. М., & Л. М. Яковлева. (2007). Антагоністична активність бацил щодо збудників бактеріальних хвороб томата. *Карантин і захист рослин*, № 12. 15–17.

111. Straight, P. D., Willey J. M., & Kolter R. (2006). Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: Role of Surfactants in Raising Aerial Structures /Journal of Bacteriology, Vol. 188, N 13. P. 4918–4925.
112. Машко, Н., О., Патица, Т., І. & Надкерничний С. П. (2006). Біопрепарат бацилотурінг для захисту рослин від комах-шкідників / Сільськогосподарська мікробіологія. Вип. 3. 113–122.
113. Herrera, D., Grossi, C., Zawoznik, M., & Groppa, M.D. (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiol. Res.* 186, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>.
114. Kloepper, J.W. & Ryu, C.M., (2006). Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. *Microbial Root Endophytes*, Springer, Berlin, 33-52. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_3.
115. Yi, H.S., Yang, J.W., & Ryu, C.M. (2013) ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field grown pepper. *Front Plant Sci.* 4, 122. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00122>.
116. Swarthout, D., Harper, E., Judd, S., Gonthier, D., & Shyne, R. (2009). Measures of leaf level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. *Environmental and Experimental Botany.* 66(1):88–93.
117. Pastoshchuk, A., & Skivka, L. (2021). Grain-Resided Endophytic Bacteria as Plant Growth Promoting and Biocontrol Agents: Food for Thought. *EC Microbiology*, 17(6): 57-58.
118. Здоровенко, Г.М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И., Захарова И. Я., & Кошечкина, Л. П. (1982). Выделение, химический состав и серологическая характеристика полисахарида *Pseudomonas wieringae*. *Микробиологический*

- журнал. 44, № 4. 65–70. th-promoting activities. *Plant and Soil*. 329(1–2):421–431.
119. Bradford, M. M. (1979). A fast and sensitive method for quantifying the amount of protein in micrograms using the principle of protein-dye binding. *Anal biochemistry*. 72: 248-254.
120. Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977) Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
121. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105, 121–126. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
122. Kumar, G. N. M., & Knowles, N.R. (1993). Changes in lipid peroxidation, lipolytic activity and activity of enzymes that trap free radicals during aging and germination of potato seed tubers. *Plant Physiol*. 102: 115-124.
123. Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.,D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207 <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
124. Díaz Herrera, S., Grossi, C., Zawoznik, M., & Groppa, M.D. (2016). Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiol Res*, 186-187:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>.
125. Agarwal, H., Dowarah, B., Baruah, P.M., Bordoloi, K.S., Krishnatreya, D.B., & Agarwala, N. (2020). Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant growth in tomato. *Microbiological Research*, 238, 126503. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126503>.

126. Rychert, C., Laske, G., & Harmon, N. (2013). Seismic image of melt in a displaced Hawaiian plume. *Nature Geosci* 6, 657-660 <https://doi.org/10.1038/ngeo1878>.
127. Sachio Tsuchida, Hiroshi Umemura, & Tomohiro Nakayama. (2020). Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules*, Volume 25(20), p. 4775. Available at <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>.
128. Anna Klindworth, Elmar Pruesse, Timmy Schweer, Jörg Peplies, Christian Quast, Matthias Horn, & Frank Oliver Glöckner, (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Research*, Volume 41, Issue 1, Page e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
129. Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.J., De Vos. P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M.S. Seldin L., & Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 8):2114-21. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>.
130. Verma, S.K., Sahu, P.K., Kumar, K., Pal, G., Gond, S.K., Kharwar, R.N., & White, J.F. (2021). Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance. *J Appl Microbiol*. 131(5):2161-2177. <https://doi.org/10.1111/jam.15111>.
131. Ващенко, Л. Н., Пасичник, Л. А., Богдан, Ю. Н., Гвоздяк, Р. И. Антимутагенная активность липополисахаридов *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: международная конференция :материалы. Минск. 2006; 68–71.

132. Ващенко, Л. Н. Антимутагенные свойства *P. syringae* pv. *atrofaciens* в бактериальной тест-системе. 7-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых, сборник тезисов. Пущино 14–18 апреля 2003; 267.
133. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2017 рік / Міністерство аграрної політики та продовольства України.
134. Пастошук, А.Ю., Сківка, Л.М. Хімічний склад ліпополісахаридів збудників бактеріозів зернових культур виду *Pseudomonas syringae*. XIV Міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології», 10-12 квітня 2018 р., Львів. Україна: збірник тез. С.249-250.
135. Грицай, Р.В., Яковлева, Л.М., & Варбанець Л.Д. (2014). Фітотоксичні властивості ліпоплісахаридів *Ralstonia solanacearum*. *Мікробіол. журн.* 76, № 2. 29–34.
136. Коцюк, А.Ю., Буценко, Л.Н., Сківка, Л.М. Влияние *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на всхожесть и рост семян пшеницы. XI международная научная конференция молодых ученых «Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане», 23-24 ноября 2017 г., Казахстан, с.157-159.
137. Pasichnik, L.A., Patyka, V.F., Khodos S.F., & Vinnichuk T.S. (2012)/ Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread. *Mikrobiol. Zhur.*74(4): 37-44.
138. Pastoschuk, A., Butsenko, L., Skivka, L., Patyka, V. The effect of *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* on the germination of wheat seeds of different varieties. III Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances». 2018 18-21 квітня. 346.
139. Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., & Somerville S. Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant J.* 2004 Dec;40(5):633-46. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02236.x.

140. Pastoshchuk, A.Yu., Skivka, L.M., Butsenko, L.M., Patyka, V.P. (2018). Effect of causal agent of basal bacteriosis on seed germination and root growth of different wheat varieties. *Microbiology&Biotechnology*, 2(42), 39-48. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134449](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134449)
141. Butsenko, L.M. (2016). Influence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* Lipopolysaccharides on Physiological and Biochemical Processes in *Allium Cera* Cells. *Mikrobiol Z*, 78(5):65–74
142. Колупаев, Ю.Е., & Карпец, Ю.В. (2009). Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам // Физиология и биохимия культ. растений. Т. 41, № 2. 95-108.
143. Колупаев, Ю.Е., Карпец, Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа. 2010; 352.
144. Колупаев, Ю.Е., Вайнер, А.А., Ястреб, Т.О. Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях. Вісник Харківського національного аграрного університету: Серія біологія. 2014;2(32):6–22.
145. Pastoshchuk, A., Yumyna, Y., Zelena, P., Nudha V., Yanovska, V., Kovalenko, M., Taran, N., Patyka, V., & Skivka, L. (2021). Beneficial traits of grain-resided endophytic communities in wheat with different sensitivity to *Pseudomonas syringae*. *Regul. Mech*, 12(3): 498-505. <https://doi.org/10.15421/022168>.
146. Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless sarguments. *Trends Microbiol*, 20(4):199-208.
147. Hulin, M., Mansfield, J.W., Brain, P., Xu X., Jackson, R.W., & Harrison, R. (2018). Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathol*, 67(5):1177-1193.

148. Baranenko, V. V. (2006). Superoxide dismutase in plant cells *Tsitologiya*, Vol. 48. № 6. P. 465–474.
149. Пастошук АЮ, Коваленко МС, Бацманова ЛМ, Сківка ЛМ. Вплив *Pseudomonas syringae* на показники оксидативного стресу, активність супероксиддесмутази та каталази в проростках озимої пшениці різних сортів. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю „Майбутній науковець – 2018”; 2018 грудень. 42.Севеодонецьк, 2018, с.42.
150. Foyer, & Christine, H. (2020) "How plant cells sense the outside world through hydrogen peroxide.", 518-519.
151. Christgen, S. L., & Becker, D. F. (2019). Role of proline in pathogen and host interactions. *Antioxidants & redox signaling*, 30(4), 683-709.
152. Mansour, M. M. F., & Salama, K. H. A. (2020). Proline and abiotic stresses: Responses and adaptation. In *Plant ecophysiology and adaptation under climate change: Mechanisms and perspectives II* (pp. 357-397). Springer, Singapore.
153. Kavi Kishor, P., Hima Kumari, P., Sunita, M., & Sreenivasulu, N. (2015). Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front Plant Sci*, 6:544.
154. Szabados, L., & Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci*. 15. 89—97.
155. Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., Yadav, M., & Upadhyay, R. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5(12):e02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>.
156. Пастошук, А., Коваленко, М., Сківка, Л. (2021). Антиоксидантні реакції проростків озимої пшениці за впливу *Pseudomonas syringae* та їхніх

- ліпополісахридів *in vitro*. Вісник КНУ Ім. Т.Г.Шевченка, Т. 84(1): 61-66.
https://doi.org/10.17721/1728_2748.2021.84.61-66.
157. Sziderics, A.H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., Wilhelm, E. (2007) Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Can J Microbiol.* 53(11), 1195-202.
<https://doi.org/10.1139/W07-082>.
158. Tamosiune, I., Baniulis, D., & Stanys, V. (2017). Role of Endophytic Bacteria in Stress Tolerance of Agricultural Plants: Diversity of Microorganisms and Molecular Mechanisms. In: Kumar V., Kumar M., Sharma S., Prasad R. (eds) *Probiotics in Agroecosystem*. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-4059-7_1.
159. Mishler-Elmore, J. W., Zhou, Y., Sukul, A., Oblak, M., Tan, L., Faik, A., & Held, M. A. (2021). Extensins: Self-assembly, crosslinking, and the role of peroxidases. *Frontiers in Plant Science*, 12, 872.
160. Keswani, C., Singh, S.P., Cueto, L., García-Estrada, C, Mezaache-Aichour, S., Glare, T.R., Borriss, R., Singh, S.P., Blázquez, M.A., & Sansinenea, E. (2020). Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(20):8549-8565. [https://doi: 10.1007/s00253-020-10890-8](https://doi:10.1007/s00253-020-10890-8).
161. Woźniak, M., Gałazka, A., Tyśkiewicz, R., & Jaroszek-Ścisł, J. (2019). Endophytic Bacteria Potentially Promote Plant Growth by Synthesizing Different Metabolites and their Phenotypic/Physiological Profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ Test. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5283.
<https://doi.org/10.3390/ijms20215283>.
162. Пастошук, А., Шустик, Д., Качкарова, Ю., Зелена П., Юмина, Ю. Фізіологічні характеристики та антагоністичні властивості ендofітних бактерій сорту озимої пшениці, стійкого до *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch). XIX міжнародна наукова конференція студентів та

молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки / Bioscience advances», Київ, Україна: збірник тез. 12-13 травня 2021; 46-49.

163. Bullock, N.O., & Aslanzadeh J. (2013). Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. In: Tang YW., Stratton C. (eds) *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3970-7_6.
164. Liu, X., Li, Q., Li, Y., Guan, G., & Chen, S. (2019). *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. *PeerJ*, 7, e7445. <https://doi.org/10.7717/peerj.7445>.
165. Brito, L.F., López, M.G., Straube, L., Passaglia, L.P. & Wendisch VF.(2020)Inorganic Phosphate Solubilization by Rhizosphere Bacterium *Paenibacillus sonchi*:Gene Expression and Physiological Functions. *Front. Microbiol.* 11:588605. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.58860>.
166. Grady, E.N., MacDonald, J., & Liu, L. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact* 15, 203 <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>.
167. Liu, Y., Wang, R., Cao, Y. *et al.* Identification and antagonistic activity of endophytic bacterial strain *Paenibacillus* sp. 5 L8 isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L., Jingke 968). *Ann Microbiol* 66, 653–660 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1150-x>.
168. Пастошук, А., Шустик, Д., Качкарова, Ю., Зелена, П., Юмина, Ю. Фізіологічні характеристики та антагоністичні властивості ендофітних бактерій сорту озимої пшениці, стійкого до *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* (McCulloch). XIX міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки / Bioscience advances», 12-13 травня 2021р., Київ, Україна: збірник тез. С.46-49.

169. Mougou, I., & Boughalleb-M'hamdi, N. (2018). Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus* spp. and garlic extract. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28, 60. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0061-0>.
170. Nehra, V., Saharan, B. S., & Choudhary, M. (2016). Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *SpringerPlus*, 5(1), 948. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2584-8>.
171. Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H., & Kim, K. S. (2015). Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The plant pathology journal*, 31(2), 165–175. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036>.
172. Torres, M.J., Brandan, C.P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C. (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiol Res*, 182:31-9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>.
173. Andrić, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020). *Bacillus* Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities. *Frontiers in microbiology*, 11, 1350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>.
174. Mülner, P., Schwarz, E., Dietel, K., Junge, H., Herfort, S., Weydmann, M., Lasch, P., Cernava, T., Berg, G., & Vater, J. (2020). Profiling for Bioactive Peptides and Volatiles of Plant Growth Promoting Strains of the *Bacillus subtilis* Complex of Industrial Relevance. *Front Microbiol*, 11:1432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01432>.

175. Pastoshchuk, A., Yumyna, Y., Zelena, P., & Skivka, L. (2021). Survey of plant growth promoting and antagonistic traits in winter wheat grain endophytic bacteria. *EUREKA: Life Sciences*, T.4: 66–72.
<https://doi.org/10.21303/2504-5695.2021.001978>.
176. Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R.C., Kumar, P., Maheshwari, D.K., & Bajpai, V.K. (2017). Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiol Res*, 205:40-47.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.012>.
177. Walitang, D.I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y.K., Kang, Y., Sa, T. (2017) Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiol*. 17(1), 209.
<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>.
178. Logan, N.A, Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M.S., Seldin, L., & Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 8):2114-21.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>. PMID: 19567583.
179. Guo, Q., Li, S., Lu, X., Li, B., Stumme, B., Dong, W., & Ma, P. (2012). *phoR* sequences as a phylogenetic marker to differentiate the species in the *Bacillus subtilis* group. *Can J Microbiol*, 58(11):1295-305. <https://doi.org/10.1139/w2012-106.30>.
180. Jun Heo, Jeong-Seon Kim, Seung-Beom Hong, Byeong-Yong Park, Soo-Jin Kim, Soon-Wo Kwon. (2019). Genetic marker gene, *recQ*, differentiating *Bacillus subtilis* and the closely related *Bacillus* species, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 366, Issue 16, fnz172, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz172>.
181. Singh, R.P., Singh, P.K., Rutkoski, J., Hodson, D.P., He, X., Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., Huerta-Espino, J. (2016)

Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54(13), 1–13.

<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-080615-095835>.

182. Snihur, H., Petrenko S., Kot T., Shevchenko O., & Polischuk V. Widespread Viral Diseases Endangering Cereal Crops in Ukraine.(2018).

Mikrobiolohichnyi Zhurnal,80(3):103-114.

<https://doi.org/10.15407/microbiolj80.03.103>.

183. Mishchenko, L. T., Dunich, A. A., Mishchenko, I. A., Petrenkova, V. P., & Mukha, T. I. (2018). Monitoring of economically important wheat viruses under weather conditions change in Ukraine and investigation of seed transmission of Wheat streak mosaic virus. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(4):660-669.

184. Гвоздяк, Р.І., Пасічник, Л.А., & Яковлева, Л.М. (2011). Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В.П. Патики. Київ: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 444.

185. Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M.J. and Schenk, P.M. (2017) Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Front. Microbiol.* 8:2552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>.

186. White, J.F., Kingsley, K.L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., Elmore, M.T., Verma, S.K., Gond, S.K., Kowalski, K.P. (2019) Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Manag Sci.* 75(10), 2558-2565. <https://doi.org/10.1002/ps.5527>.

187. Singh, D.P. et al. (2019). *Microbial Interventions in Agriculture and Environment*. Springer Nature Singapore Pte Ltd.

<https://doi.org/10.1007/978-981-13-8383-0> .

188. Веремейченко, С. Н., Здоровенко, Г. М. (2008). Особенности строения и иммуномодулирующие свойства липополисахаридов бактерий рода *Pseudomonas* // Прикладная биохимия и микробиология, Т. 44, № 6. 632–641.
189. Варбанец, Л. Д., Винарская, Н. В. (2002). Структура, функция, биологическая активность эндотоксинов грамотрицательных бактерий / Сучасні проблеми токсикології, № 1. 9–13.
190. Newman, M.A., & Dow, J. M. (2001). Daniels. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions. *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 107. P. 95–102.
191. Jones, J.D., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*. Nov 16;444(7117):323-9. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
192. Yu, X., Feng, B., He, P., Shan, L. (2017). From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu Rev Phytopathol* 55:109–137.
193. Neill, E.M., Mucyn, T.S., Patteson, J.B., Finkel, O.M., Chung, E.H., Baccile, J.A., Massolo, E., Schroeder, F.C., Dangl, J.L., Li, B. (2018). Phevamine A, a small molecule that suppresses plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(41):E9514-E9522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803779115>.
194. Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., & Van Camp, W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5818-5823.
195. Dey, N., Roy, U. K., Aditya, M., & Bhattacharjee, S. (2020). Defensive strategies of ROS in Programmed Cell Death associated with hypersensitive response in plant pathogenesis. *Annals of Systems Biology*, 3(1), 001-009.

196. Mishler-Elmore, J. W., Zhou, Y., Sukul, A., Oblak, M., Tan, L., Faik, A., & Held, M. A. (2021). Extensins: Self-assembly, crosslinking, and the role of peroxidases. *Frontiers in Plant Science*, 12, 872.
197. Li, L., Harmon, A.C., Chen, S. (2019). Plant immune responses - from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. *Plant Signal Behav.* 14(5):e1588667. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1588667>.
198. Das, K., & Roychoudhury, A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2:53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
199. Baranenko VV. Superoxide dismutase in plant cells. *Tsitologiya*. 2006;48(6):465-74.
200. Hamilton, C.E., Pedro, G., Helander, M., & Saikkonen, K. (2012). Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: A review. *Fungal Diversity*, 54:1–10. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0158-9>.
201. Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., & Pileggi, M. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat // *J. Plant Physiol*, 164, N 10. 1367—1376.
202. Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., & Amrutha, R.N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88. 424—438.

Документ підписано у сервісі Вчасно (продовження)

Аліна Пастоцук_рукопис_PhD.pdf

Документ відправлено: 13:38 23.06.2022

Власник документу

Електронний підпис

13:38 23.06.2022

Ідентифікаційний код: 3432903281

Пастоцук Аліна Юріївна

Власник ключа: Пастоцук Аліна Юріївна

Час перевірки КЕП/ЕЦП: 13:38 23.06.2022

Статус перевірки сертифікату: Сертифікат діє

Серійний номер: 3ED5083160DBC59B04000000773C4E001E108400