

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07 – МР. 1917 «С». 2021.12.04. 5 ПЗ

НУБІП України

ГОВОРОВ ЗАХАР МИКОЛАЙОВИЧ

НУБІП України

2021

Н

1

Н

1

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 504.5:628.4.047(477-25)

ПОГОДЖЕНО ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Декан факультету Завідувач кафедри
захисту рослин, біотехнологій та екології інтегрованого захисту та карантину
рослин

Коломієць Ю.В. Доля М.М.
« » 2021 р. « » 2021 р.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА
на тему «Біологічні особливості збудника бактеріозу гречки та
біотехнологічні аспекти контролю його поширення»
Спеціальність 202 «Захист і карантин рослин»
(код і назва)

Освітня програма: Захист рослин
(назва)
Орієнтація освітньої програми: освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Керівник магістерської роботи
Д. С.-Г. наук, професор
(науковий ступінь та вчене звання)
К. С.-Г. наук, доцент
(науковий ступінь та вчене звання)

Коломієць Ю.В.
(підпис)
Сикало О.О.
(підпис)

Виконав
Говоров З.М.
(підпис) (ПІБ студента)
Київ-2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології
Кафедра інтегрованого захисту та карантину рослин
Освітня програма «Магістр»
Напрямок підготовки 202 «Захист і карантин рослин»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри

« _____ » _____ 2021 р.

ЗАВДАННЯ
НА ВИПУСКНУ
МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Говорову Захару Миколайовичу
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біологічні особливості збудника бактеріозу гречки та біотехнологічні аспекти контролю його поширення
керівник роботи д.с.-г.н., професор Коломієць Юлія Василівна

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБіП України від "04" грудня 2021 р. № 1917 «С»

2. Строк подання студентом роботи 10 листопада 2021 року

3. Вихідні дані до роботи збудники гречки посівної, штами-антагоністи, екстракт часнику

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата завдання видав	завдання прийняв
1	д.с.-г.н., професор Коломієць Ю.В.		
2	д.с.-г.н., професор Коломієць Ю.В.		
3	д.с.-г.н., професор Коломієць Ю.В.		

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної магістерської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1		Вересень-жовтень	
2		Листопад-грудень	
3		Січень-лютий	
4		Березень-квітень	
5		Квітень-травень	

Студент _____
(підпис)

Говоров З.М.
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Коломієць Ю.В.
(прізвище та ініціали)

Реферат

Робота виконана на 57 сторінках, містить 3 розділи, 5 рисунків, 3 таблиці, 72 використаних джерела.

Метою роботи було вивчити біологічні особливості збудника бактеріозу гречки та біотехнологічні аспекти контролю його поширення.

Бактеріальні хвороби гречихи стають все більш серйозними бактеріальними захворюваннями, викликаються *Pseudomonas syringae* pv.

syringae. Метою нашого дослідження було оцінити антибактеріальний потенціал штамів роду *Bacillus* та екстракти часнику проти двох *Pseudomonas*

syringae pv. *syringae* (PPS13 та PSS15). Штами роду *Bacillus* були виділені з безсимптомно листя гречихи. В умовах *in vitro* 21 штам *Bacillus* та екстракт

часнику виявили антибактеріальну активність проти патогену. В умовах тепличних, антагоністичних бактерій, екстракт часнику, та сульфат міді

підтвердила протимікробну дію на *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та значно зменшили протяжність некрозу стебла через 10 тижнів після

інюкуляції ВАС13 до 60,55, 56,11 та 45,83 до 70,83, 62,5 та 46,52% щодо відповідних обробок. У наших результатах екстракт часнику був найбільш

ефективним засобом лікування, і ми припускаємо, що екстракт *Allium sativum* можна використовувати для контролю та запобігання зараженню

патогеном.

НУВІП України

ЗМІСТ

Вступ

8

Розділ 1. Огляд літератури 11

1.1. Бактеріоз гречихи 11

1.2. Ферменти, що руйнують компоненти рослинних клітинних стінок 12

1.2.1. Бактеріальні ферменти, що руйнують целюлозу 15

1.2.2. Бактеріальні ферменти, що руйнують сполучні глікани 16

1.2.3. Бактеріальні ферменти, що руйнують пектинові речовини 18

1.3. Система секреції третього типу 23

Розділ 2. Об'єкти і методи досліджень 26

2.1. Бактеріальні штами та ізоляти 26

2.2. Зберігання та одержання часнику 26

2.3. Аналіз екстракту часнику на вміст аліцину 27

2.4. Виділення та ідентифікація бактерій-антагоністів 27

2.5. Кількісний аналіз антимікробної активності антагоністичних бактерій щодо *P. syringae* 28

2.6. Кількісний аналіз антимікробної активності екстракту часнику проти *P. syringae* pv. *syringae* 30

2.7. Аналіз антимікробної активності екстракту часнику та антагоністичних бактерій *in vivo* проти розвитку хвороби 31

2.8. Статистичний аналіз даних 31

Розділ 3. Результати досліджень 32

3.1. Характеристика бактеріальних ізолятів 32

3.2. Ідентифікація бактерій-антагоністів 33

3.3. Антимікробна активність антагоністичних бактерій щодо *P. syringae* pv. *syringae* 34

3.4. Антимікробна активність екстракту часнику проти *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 37

3.5. Антимікробна активність екстракту часнику та бактерій-антагоністів щодо розвитку бактеріозу на рослинах гречки *in vivo* ... 41

Висновки 50

Список використаних джерел 51

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Фітопатогенні бактерії можуть спричинити розвиток серйозних патологій у культурних рослин і призводити до значних втрат урожаю. В

Україні проблему бактеріозів рослин, як і в багатьох інших країнах світу,

недооцінюють. Основними причинами захворювання сільськогосподарської продукції вважалися фітопатогенні гриби, а бактеріям при цьому приділяли значно меншу увагу. Однак останніми роками, у тому числі в низці регіонів

України, захворювання, викликані фітопатогенними бактеріями, вийшли на рівень епіфітотій (епідемії) (Говорів із співавт., 2015; Санін, 2016). На першому місці за ураженістю фітопатогенними бактеріями знаходяться картопля та овочеві культури (Санін, 2016). Серед бактеріозів

картоплі найбільших збитків завдають кільцева гнилизна (збудники - представники роду *Clavibacter*), а також м'яка (або мокра) гнилизна і чорна ніжка, викликані фітопатогенними бактеріями родів *Dickeya* та *Pectobacterium* (Карлов із співавт., 2010, 2011; Toth et al., 2011; Лазарев, 2013; Єрохова, Дренова, 2014; Ігнатов із співавт., 2014). Широке поширення в

Україні набув судинний бактеріоз капусти, що викликається деякими фітопатогенними ксантомонадами (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, X. *arboricola*). Це захворювання, характерне для всіх основних зон вирощування цієї культури, призводить до втрати 10–80% врожаю капусти, насамперед при зберіганні (Харламов, Ігнатов, 2001).

Велику шкоду (40–70% врожаю) завдає фітопатоген *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, що викликає чорну бактеріальну плямистість томату та деяких інших культур (Корнев із співавт., 2010). Крім ксантомонад, томати інтенсивно уражаються бактеріями *Clavibacter michiganensis* (бактеріальний рак) та *Pseudomonas corrugata* (серцевий некроз).

В останні роки в Україні відзначається спалах бактеріозів зернових і хлібних (круп'яних) культур. На початку 2000-х років збудників базального бактеріозу (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та *P. syringae* pv. *atrofaciens*) та

бактеріальної кореневої гнилі (*Pseudomonas marginalis*) зернових детектували в насіннєвому матеріалі менш ніж у 1% випадків; зараз вони виявляються в 10% випадків (Пасічник із співавт., 2014; Ігнатів із співавт., 2015). Основні

збитки ці патогени завдають озимим культурам при низьких температурах. У

Центральних регіонах зернові культури сильно вражаються чорним бактеріозом, що викликається *Xanthomonas translucens*. Втрати врожаю при спалаху чорного бактеріозу можуть досягати 60% (Матвєєва з співавт., 2006).

У 2010-2014 роках відзначено появу нового для України збудника захворювань злакових (рис, овес, кукурудза, пшениця) та інших культур –

Pantoea ananatis. Бактерії цього виду викликають плямистість на листі, в'янення та опіки зернових, а також цибулі, томату та дині (Coutinho, Venter, 2009).

Вирішення проблеми бактеріозів рослин в Україні передбачає

використання комплексного підходу. По-перше, потрібна оптимізація агротехнологічних заходів. Більша частина олійськобездарської продукції інфікується фітопатогенними бактеріями при збиранні, сортуванні та зберіганні врожаю (Дементьєва, 1988). У зв'язку з цим потрібна розробка

підходів, які дозволять знизити випадки контамінації рослинного матеріалу паразитами за цих процедур. Недотримання правил сівозміни та технологій

обробітки культурних рослин також може спричинити спалах бактеріозів. Застосування підвищених доз мінеральних добрив часто є причиною

розвитку захворювань рослин, а використання пестицидів, на додаток до негативного впливу на довкілля та організм людини, може призводити до

появи важкоконтрольованих штамів патогенів, стійких до засобів захисту рослин (Захаренко, 2015; Санін, 2016).

Безумовну важливість для контролю за захворюваннями рослин має ефективна діагностика фітопатогенів у агрофітоценозах. У зв'язку з цим є

необхідність розширення мережі сертифікованих діагностичних підрозділів та оптимізації методів виявлення фітопатогенних бактерій, яка дозволить

збільшити достовірність та надійність діагностики, а також оперативність та регулярність її проведення. Особливу важливість діагностичні заходи мають у передпосівний період для грамотного розподілу посівних площ

залежно від складу мікрофлори, а також у післяжнивний період, щоб не допускати закладку контамінованої патогеном продукції на тривале зберігання

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП України

1.1. Бактеріоз гречихи

Перші ознаки хвороби виявляються під час бутонізації – початку цвітіння гречки. На листі з'являються невеликі одиночні маслянисті темно-бурі округлі плями, які зливаються пізніше. Уражена тканина часто набуває червоного відтінку з вираженою концентричністю. Уражене листя жовтіє, в'яне і засихає.

НУБІП України

Збудником хвороби є бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, які, крім гречки, вражають багато видів культурних та дикорослих рослин.

НУБІП України

Поширюються бактерії механічним шляхом: розносяться комахами, крапельками дощу, а також зі шматочками ураженого листя, що засохло. Основне джерело інфекції – неперегнилі уражені залишки та насіння.

НУБІП України

Шкода хвороби проявляється у зменшенні асиміляційної поверхні рослин внаслідок передчасного відмирання ураженого листя, уповільнення росту та розвитку рослин, відмирання уражених бутонів, квіток та цілих суцвіть, формування плоского насіння, суттєво знижує врожайність культури.

НУБІП України

НУБІП України

Н

Н



Рис. 1. Симптоми бактеріальної плямистості на листках грецької каштана.

НУБІП України

1.2. Ферменти, що руйнують компоненти рослинних клітинних

стінок

Мають ключову особливість стратегії взаємодії фітопатогенів з рослинами, порівняно з тактикою, що застосовується патогенами, що колонізують тваринний організм, пов'язана з наявністю у рослинних клітин

додаткового, дуже потужного та динамічного клітинного компартменту –

рослинної клітинної стінки (РКС).

Ця особливість полягає у застосуванні великого арсеналу ферментів, що секретуються за межі бактеріальної клітини, руйнують різні полімери

РКС, насамперед полісахариди. Завдяки цьому мікроорганізми, по-перше,

здатні «розщипувати» РКС для переміщення всередині рослинних тканин і,

по-друге, отримувати поживний субстрат у вигляді низькомолекулярних вуглеводів, які «приховані» у складі масивних полісахаридних ланцюгів.

Велика різноманітність фітопатогенів ферментів, що руйнують компоненти РКС, пов'язана з колосальною гетерогенністю полісахаридів, яка

визначається наступними основними причинами (Горщикова, 2007).

По-перше, існує близько десятка різноманітних «разових конструкцій» полісахаридів РКС – характерних кістяків, що відрізняються набором

моносахаридів та/або характером їх зв'язків між собою (Горшкова зі співавт., 2013). Наприклад, β -1,4-зв'язані залишки глюкози – це «будівельна» основа целюлози і кеїлортолана, а β -1,4-зв'язані залишки кеїлози формують кістяки (Fry, 1988; Carpita, Gibeaut, 1993; Brett, Waldron, 1996).

По-друге, до кістяків можуть бути приєднані бічні ланцюги, що варіюють за складом, довжиною, наявністю включень із «нехарактерних» моносахаридів; може відрізнитися і характер розподілу бічних ланцюгів по кістяку молекули.

По-третє, дві молекули одного і того ж типу полісахариду можуть відрізнитися за наявністю та розташуванням модифікуючих груп, серед яких найбільш поширені метоксильні та ацетильні; ці групи можуть суттєво змінювати доступність полімеру для дії ферментів, а також самі служити мішенню для певних ферментів (пектинметилестерази).

По-четверте, нематричний характер синтезу складних полісахаридів призводить до їх мікрогетерогенності та неідентичності молекул одного і того ж типу полісахариду, які можуть різнитися в деяких межах за кількісними параметрами, наприклад, таким як молекулярна маса, довжина ланцюгів, кількість заміщень кістяка або модифікуючи груп на макромолекулу (Бонков із співавт., 1980).

Кожен фермент, своєю чергою, має досить вузьку специфічність; тому для руйнування навіть одного типу полімерів може знадобитися кілька, а то й десятки різних ферментів.

Бактеріальні ферменти, що руйнують полісахариди РКС, відносяться до кількох класів: глікозил-гідролази, полісахарид-ліази, вуглевод-естерази (Jayani et al., 2005; Наумов, 2011; Saritha et al., 2016).

Перші два типи ферментів можуть мати або екзо-, або ендоактивність.

У разі екзоактивності ферменти здатні відщеплювати від ланцюга полісахариду тільки кінцеві одиничні моносахариди (іноді дисахариди), ендоферменти руйнують глікозидні зв'язку на відстані не менше двох моносахаридних залишків від кінців молекули полімеру.

Екзоферменти, що відносяться до глікозил-гідролазів, можуть відщеплювати моносахарид як з кінця, що відновлює (такі ферменти найбільш поширені і називаються глікозидазами), так і з невідновлювального кінця (екзогліканази). Детальна інформація про різні класи ферментів, активних щодо полісахаридів, представлена в базі даних CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database, www.cazy.org).

Глікозил-гідролази руйнують глікозидний зв'язок шляхом присіднання молекул води (Henrissat, Davies, 1997), а полісахарид-ліази - негідролітичним шляхом, без участі молекул води, за рахунок реакції β -елімінування; характерною рисою такого розщеплення служить утворення ненасиченого залишку уронувої кислоти з невідновлювального кінця фрагмента полімеру, що вийшов (Moran et al., 1968; Linhardt et al., 1987).

Вуглевод-естерази здійснюють деестерифікацію полісахаридів (відщеплення метоксильних та ацетильних груп). Хоча естерази не є деполімеразами полісахаридів, ці ферменти вносять значний внесок у розщеплення цих полімерів. Доступність полісахаридів для бактеріальних деполімераз (гідролази та ліази) часто залежить від ступеня метилювання/ацетилювання полісахаридів РКС (Tardy et al., 1997; Pawar et al., 2013).

При цьому значення має не тільки загальний ступінь метоксилювання або ацетилювання, а й характер розташування модифікуючих груп на вуглеводних залишках молекули, який може бути безладним або блоковим (Горщикова, 2007).

Відщеплення модифікуючих груп під дією естераз може як сприяти збільшенню ефективності роботи деполімераза, так і, навпаки, перешкоджати гідролізу полісахариду. Так, наприклад, ферментативне видалення ацетильних груп підвищує ефективність гідролізу лігноцелюлозної біомаси β -ксилозидазами, β -маннозидазами та β -глюкозидазами (Pawar et al., 2013), а деацетилювання пектинів, навпаки, може запобігати руйнуванню цих полісахаридів деякими пектиназами (Gou et al., 2012).

Водночас ефективність відщеплення модифікуючих груп естеразами може підвищуватися завдяки дії деполімераз. Це, зокрема, було продемонстровано на прикладі пектинацетиластерази *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*), що «віддає перевагу» як субстрату деполімеризовані та деметиловані фрагменти пектинів (Shevchik, Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003).

Полісахариди РКС прийнято розділяти на три основні типи: целюлоза, сполучні глікани, іноді звані геміцелюлозами, та пектинові речовини. Кожен тип полісахаридів руйнується певною групою ферментів.

1.2.1. Бактеріальні ферменти, що руйнують целюлозу

Целюлоза є домінуючим за змістом компонентом РКС.

З одного боку, цей полімер досить простий: він складається з одного типу мономерів (залишки глюкози), з'єднаних одним типом зв'язку (β -1,4). З іншого боку, через високий рівень полімеризації та особливої надмолекулярної структури целюлози цей полімер важко назвати простим.

Ступінь його полімеризації часто перевищує 10 тисяч мономерів (Hon, Shiraishi, 1991), т. е. молекулярна маса може становити приблизно 2 млн.

дальтон. Біосинтез целюлози здійснюється мультиферментними целюлозосинтазними комплексами (Pear et al., 1996; Kimura et al., 1999; Saxena, Brown, 2000, 2005; Somerville et al., 2004), розташованими на

плазмалеммі, завдяки чому виключається етап секреції цього гігантського полісахариду (майже всі інші полісахариди клітинної стінки синтезуються в апараті Гольджі і секретуються за допомогою везикул, що відшнуровуються від нього).

За межами плазмалеми кілька десятків ланцюгів β -1,4-глюкану, що продовжуються за участю відповідної кількості субодиниць целюлозосинтази, об'єднуються між собою мікрофібрилу. При формуванні мікрофібрил можуть виникати кристалічні ділянки (O'Sullivan, 1997), в яких молекули целюлози

упаковані настільки щільно, що навіть порівняно невеликі молекули, наприклад, такі як вода, не можуть у них проникнути. Така організація целюлози дуже ускладнює ферментативний гідроліз цього полісахариду (Arantes, Saddler, 2010).

Незважаючи на те, що окремі ланцюги β -1,4-зв'язаної глюкози можуть руйнуватися досить великою групою ферментів, руйнування мікрофібрил целюлози — це доля «обраних» ферментів, які називаються целюлазами і складаються фактично з кількох типів гідролаз, що працюють узгоджено (Sadhu, Maiti, 2013; Fariq, 2016).

Целюлази включають чотири типи ферментів, що діють спільно:

1) ендо- β -1,4-глюканази, неупорядковано гідролізують у целюлозі β -1,4-зв'язку, приводячи до утворення целоолігосахаридів, глюкози та целотріози (трисахарид із трьох залишків глюкози);

2) екзо- β -1,4-глюканази - целобіогідроксилази, що відщеплюють целобіозу (дисахарид з двох залишків глюкози) або глюкозу з невідновлених кінців целоолігосахаридів;

3) екзо- β -1,4-глюкозидази, що відщеплюють поодинокі глюкозні залишки з відновлювальних кінців полісахаридних ланцюгів, і

4) целобіази, що розщеплюють дисахарид на дві молекули β -D-глюкози (Левіна з співавт., 2016).

Вважається, що у забезпеченні доступності молекул целюлози для гідролітичних ферментів істотну роль відіграють експансини — білки, які самі не мають ферментативної активності, але мають спеціальний вуглеводзв'язуючий домен і здатні порушувати водневі зв'язки між молекулами целюлози (McQueen-Masson, Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2000).

Показано, що експансини бактерій збільшують ефективність ферментативного гідролізу целюлози (Kerff et al., 2008).

1.2.2. Бактеріальні ферменти, що руйнують сполучні глікани

Мікрофібрили целюлози в рамках складної надмолекулярної структури РКС «зшиваються» між собою за допомогою сполучних гліканів (Carré, Gibeaut, 1993; Горшкова, 2007). Зшивання при цьому відбувається завдяки утворенню водневих зв'язків між мікрофібрилами целюлози та сполучними гліканами. Цей «альянс» динамічний, та його «фортеця» чітко регулюється відповідними ферментами з потреби клітини. Так, у ході зростання розтягуванням відбувається модифікація сполучних гліканів (їх гідроліз, трансглікозилування), внаслідок чого водневі зв'язки між ними і мікрофібрил целюлози ослабшають і створюються умови для розходження мікрофібрил целюлози. Такий ефект може досягатися і за участю експансинів. Подібний спосіб розпушування РКС використовують і фітопатогени, синтезуючи гідролітичні ферменти, що руйнують сполучні глікани, а також продукуючи експансин-подібні білки. Ймовірно, це дозволяє формувати в РКС пори для ефективного переміщення бактеріальних клітин з цього клітинного компартменту. Ще один спосіб забезпечення розбіжності мікрофібрил целюлози в рослинних тканинах пов'язаний з трансглікозилуванням сполучних гліканів, що здійснюється за допомогою рослинних ферментів ксилоглоканендотрансглікозилаз (XET/XTH): однак такі ферменти та гени, які могли б їх кодувати, у фітопатогенних бактерій не описані.

Сполучні глікани представлені кількома групами полімерів.

Домінуючим сполучним гліканом первинних РКС дводольних рослин є ксилоглокан - розгалужений гетерополімер, кістяк якого складається з залишків глюкози, а бічні ланцюги декількох типів включають, головним чином, залишки ксилози, а також можуть містити залишки галактози, фукози та арабінози (O'Neill, York, 2003). Серед геміцелюлоз первинної клітинної стінки злаків представлені глюкоані зі змішаним типом зв'язків та глюкуроноарабіноксилан, кістяк якого складається з залишків ксилози, а бічні ланцюги включають залишки арабінози та/або глюкуронової кислоти

(Darvill et al., 1980; Carpita, 1996). Ксилани є також ключовими сполучними гліканами потовщених вторинних РКС (Ebringerova, Heinze, 2000). Крім цього, серед геміцелюлоз описані маннозосодержащі полісахариди - маннани, кістяк яких побудований з залишків маннози, а також

глюкоманнани і галактоглюкоманнани, кістяк яких містить залишки манози і глюкози, що чергуються (Stephen, 1983). Ці полісахариди характерний компонент клітинних стінок пасльонових та голонасінних

Описано велику групу рослинних ферментів, що у модифікації різних типів сполучних гліканів (www.cazy.org). Ферментами, що руйнують ці полісахариди, «озброєні» та фітопатогенні бактерії. У ксантомонад

(*Xanthomonas campestris*) охарактеризована ксилоглюкан-специфічна ендоглюканаза (de Araújo et al., 2013; Feng et al., 2014). Крім того, у геномах багатьох фітопатогенних бактерій є гени, анотовані як кодуючі ендо- β -1,4-глюканази, які, ймовірно, можуть руйнувати ксилоглюкан; однак експериментального підтвердження цього поки що отримано не було.

Руйнування ксиланів може відбуватися за допомогою різних екзо- та ендоферментів (Beg et al., 2001; Collins et al., 2005; Walia et al., 2017). Ендо- β -

1,4-ксиланаза та екзо- β -ксилозидазу розщеплюють кістяки ксиланів, а бічні ланцюги можуть відщеплюватися за участю екзоферментів β -ксилозидаз та α -арабінофуранозидаз. Ці ферменти широко описані на прикладі ксилотичних грибів (Driss et al., 2012), але на прикладі фітопатогенних

бактерій експериментально охарактеризовано лише два ферменти: β -глюкозидазу/ксилозидазу *Erwinia chrysanthemi* (Dickeya dadantii) і ксиланаза *Xanthomonas oryzae* (Vroemen et al., 1995; Rajeshwari et al., 2005). Проте в геномах багатьох фітопатогенних бактерій є гени, схожі з генами, що кодують ферменти деградації ксиланів.

Глюкан зі змішаним типом зв'язків гідролізують β -1,3;1,4-глюканази, більше відомі як ліхенази (Barras, Stone, 1969), оскільки одним із описаних субстратів для цих ферментів є ліхенін (β -1,3;1,4-глюкан, що міститься у

лишайниках). Бактеріальні ліхенази здатні руйнувати β -1,3,1,4-глюкани, які становлять основну масу клітинної стінки ендосперму насіння злакових (Planas, 2000). Цікаво, що ліхенази, що продукуються рослинами та

мікроорганізмами (грибами та бактеріями), кардинально відрізняються амінокислотними послідовностями та тривимірною структурою (навіть відносяться до різних родин глікозил-гідролаз), що можна розцінювати як приклад конвергентної еволюції ферментів щодо одного і того ж субстрату (Planas, 2000).

1.2.3. Бактеріальні ферменти, що руйнують пектинові речовини

Найбільш дослідженими факторами вірулентності фітопатогенних бактерій є ферменти, що руйнують пектинові полісахариди (Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003; Jayani et al., 2005; Álvarez et al., 2010; Chalupowicz et al., 2017). Пектини в РКС виконують функцію матриксу, який занурений целюлозний каркас (McCann, Roberts, 1991; Carpita, Gibeaut, 1993), а також є основним компонентом серединної платівки, що забезпечує «склеювання» сусідніх рослинних клітин (Caffall, Mohnen, 2009). Часті симптоми мацерації рослинних тканин при патогенезі якраз пов'язані з руйнуванням пектинів серединної пластинки, що призводить до «відклеювання» клітин один від одного та утворення зі структурованої тканини безформної маси.

Руйнування компонентів саме серединної платівки відбувається, мабуть, внаслідок того, що більшість фітопатогенів не проникає всередину протопласту рослин (зокрема через складність розщеплення целюлози), а живе в апопласті і поширюється по рослині, руйнуючи серединну платівку.

Ферменти, що розщеплюють пектинові полісахариди, описані практично для всіх фітопатогенних бактерій; проте їхня різноманітність та рівень продукції можуть істотно відрізнитися залежно від видової приналежності патогена, й у першу чергу від його трюфності. Біотрофні патогени, "м'яко" що впливають на рослинний організм, продукують значно

менше/деполімераз пектинових речовин у порівнянні з некротрофами, що застосовують тактику «грубої сили» (Agrios, 2005).

Пектинові полісахариди, які завжди мають у складі залишки α -

1,4-пов'язаної галактуранової кислоти, поділяють на три основні типи:

гомогалактуронан (полігалактуранова кислота), рамногалактуронан I та рамногалактуронан II (Ridley et al., 2001; Caffall, Mohnen, 2009; Оводов, 2009). Гомогалактуронан становить основну масу (до 90%) пектинових

полісахаридів. Цей лінійний гомополімер складається із залишків галактуранової кислоти. Варіабельність його структури забезпечується

різним ступенем полімеризації та особливостями метилювання/ацетилювання. Саме цей пектиновий полісахарид є основною мішенню для більшості фітопатогенів (Barras et al., 1994).

Його руйнування здійснюється ендо- та екзоферментами, що відносяться до глікозид-гідролазів (полігалактуроназа), діаз (пектат/пектинліаза) та естераз (пектинметилпектинацетиластерази) (Jaupri et al., 2005). Різні ферменти можуть виявляти специфічність до того чи іншого варіанта гомогалактуронану.

Так, наприклад, пектинліази розщеплюють тільки метильований гомогалактуронан, у той час як для активності пектатліаз ступінь метилювання полімеру не має значення (Bonnin et al., 2009).

Рамногалактуронан I, незважаючи на його низький порівняно з полігалактурановою кислотою вміст, також активно руйнується деякими

фітопатогенними бактеріями під час колонізації рослин. Рамногалактуронан I - це розгалужений гетерополімер, кістяк якого складається з залишків рамнози, що чергуються, і галактуранової кислоти (Lau et al., 1985). Бічні

ланцюги цього полімеру, що приєднуються до залишків рамнози,

представлені, головним чином, залишками галактози або арабінози і можуть складатися як з одиничних моносахаридних залишків, так і досить протяжними (до декількох десятків мономерів) (Ridley et al., 2001; Caffall,

Молчан, 2009; Уаро, 2011). Варіабельність структури цього полімеру пов'язана з різною ступенем його полімеризації, а також типом, характером розподілу по кістяку та протяжністю бічних ланцюгів (Уаро, 2011; Мікішина з співавт., 2015).

Ферменти, що розщеплюють кістяк рамногалактуронана I (гідролази та ліази), і гени, що їх кодують, описані тільки на прикладі некротрофних фітопатогенних бактерій; у біотрофів ці ферменти (і відповідні їм гени) не виявлено. Цей факт можна пояснити відмінностями у згаданих вище стратегіях «м'якої та грубої сили», що застосовуються біотрофами та некротрофами відповідно. Так, некротрофи націлені на максимально можливе використання поживного субстрату, укладеного в полімери РКС, і тому спектр руйнівних ними полісахаридів (а як наслідок, і спектр ферментів) ширше, ніж у біотрофів. Оскільки рамногалактуронан I може виконувати важливу структурну функцію в РКС, його руйнування при патогенезі може інтенсифікувати процес мацерації тканин і поширення патогену, чого і «добиваються» некротрофи при колонізації рослин. Крім того, некротрофні пектобактерії (*Pectobacterium atrosepticum*) використовують фрагменти цього полімеру як екстраклітинного матриксу при колонізації судин ксилеми, де мікроорганізми формують особливі «багатоклітинні» структури - бактеріальні емболи (Gorshkov et al., 2014, 2016).

Розщеплення бічних ланцюгів рамногалактуронана I, ймовірно, також відбувається під час інфекції. Фітопатогенні мікроорганізми мають ряд ферментів, анованих як галактанази, галактозидази, арабінази, арабінозидази, які імовірно здатні розщеплювати глікозидні зв'язку у бічних ланцюгах цього полімеру (Silva et al., 2016). Цікаво, що «відключення» гена, що кодує галактаназу (імовірно руйнує бічні ланцюги рамногалактуронана I), більшою мірою позначалося на вірулентності *Pectobacterium atrosepticum*, ніж мутація за геном ферменту, що розщеплює кістяк цього полімеру (рамногалактуронілгідролаза) (Ковтунов з співавт., 2018).

Це свідчить про те, що модифікація бічних ланцюгів рамногалактуронану I важлива для інтенсивного розвитку гнильних процесів у рослинах.

Рамногалактуронан II за різноманітністю мономерів (12 різних) і типів зв'язків між ними є найскладнішим із відомих у живих організмах полісахаридів. Хоча він складається всього з 60 моносахаридних залишків, кількість різноманітних типів зв'язків між ними становить 20 (Darvill et al., 1978). Структура рамногалактуронана II виключно консервативна і, незважаючи на її складність, практично не відрізняється у різних видів рослин та в різних тканинах (Matsunaga et al., 2004). Ферменти, що руйнують цей полімер, для фітопатогенних бактерій поки що не описані.

Для використання як живильний субстрат продукти розпаду складні вуглеводи повинні транспортуватися в цитоплазму бактерій. Цей процес здійснюється у кілька етапів. Після деполімеризації складних вуглеводів ферментами, бактеріями, що секретуються, утворені олігосахариди доставляються в периплазматичний простір за допомогою спеціальних переносників. Мутантні бактерії, дефектні за генами таких переносників, здатні використовувати як живильний субстрат фрагменти полігалактуронану зі ступенем полімеризації більше трьох моносахаридних залишків (Blot et al., 2002). У периплазмі олігосахариди розщеплюються периплазматичними ферментами (переважно екзоферментами) до ди- і тримерів.

Потім ці низькомолекулярні олігосахариди переносяться в цитоплазму і окислюються в процесі дихання (Salmond, 1994; Lory, 1998; Corbett et al., 2005; Davidsson et al., 2013).

Крім деполімераз полісахаридів і вуглевод-естераз, до бактеріальних ферментів, які руйнують компоненти РКС, також відносять протеази. Оскільки ці ферменти доставляються з бактеріальних клітин до апопласту, очевидно, що їх мішенями є білки РКС. Хоча екстраклітинні протеази (або гени, що кодують) виявлені практично у всіх відомих фітопатогенних бактерій, цілі цих ферментів виявлено лише кількох представників. У *Erwinia*

carotovora (*Pectobacterium carotovorum*) секретуються протеази руйнують глікопротеїни — лектини, які, мабуть, виконують сигнальну функцію під час активації захисної відповіді (Marits et al., 1999). Протеази *Xanthomonas*

campestris руйнують гідроксипролін-багаті білки і в тому числа екстенсини (Dow et al., 1998). Останні є структурними компонентами РКС і завдяки

наявності у складі великої кількості ароматичних амінокислот, здатні формувати зв'язки з лігніном та полісахаридами РКС (Cooper et al., 1987).

Завдяки цьому екстенсини забезпечують зшивання різних полімерів, що зумовлює збільшення бар'єрних властивостей РКС. В свою чергу, протеази,

що секретуються бактеріями та руйнують екстенсини, дозволяють запобігти патоген-індукованому зміцненню РКС. Лектини та гідроксипролін-багаті білки можуть брати участь в аглютинації клітин мікроорганізмів

(склеювання, іммобілізація та наступний лізис) (Нікітіна з співавт., 2001),

тому руйнування цих білків бактеріальними протеазами може сприяти інтенсивному розмноженню патогенів *in planta* та розвитку інфекції.

Таким чином, руйнування полімерів РКС є одним із основоположних аспектів життя фітопатогенних бактерій усередині рослин, який дозволяє

мікроорганізмам як отримувати ростовий субстрат, так і ефективно поширюватися апопластом. Для цього фітопатогенні бактерії в ході еволюції

придбали гени, що кодують велику різноманітність ферментів, що модифікують РКС.

1.3. Система секретії третього типу

Однією з основних особливостей системи секретії третього типу (ССЗТ) є її особливий пристрій, який дозволяє транспортувати субстрати з

цитоплазми бактеріальних клітин у позаклітинне середовище, а й безпосередньо всередину клітин рослини-господаря. Транспортний канал

(пиль) цієї системи пронизує не тільки внутрішню та зовнішню мембрани бактеріальної клітини, а й клітинну стінку, та плазмалемму клітини рослини-господаря.

НУБІП УКРАЇНИ

ССЗТ є лише у грамнегативних бактерій, що живуть у тілі вищих організмів (рослини, тварини); для сапрофітних бактерій ця система не характерна (Tseng та ін., 2009).

НУБІП УКРАЇНИ

Субстратами ССЗТ у фітопатогенів є дві групи білків: ефектори та харпіни. В амінокислотних послідовностях цих білків є N-кінцевий сигнальний пептид, необхідний їх ССЗТ-залежної секреції. Ці білки транспортуються у вигляді поліпептидних ланцюгів без вторинної, третинної та четвертинної структури, і ряд з них секретується разом зі специфічними шаперонами, які забезпечують правильне пакування білка вже в тілі господаря (Green, Meenas, 2016).

НУБІП УКРАЇНИ

Роль ефекторів і харпінів, а також усієї ССЗТ у цілому у взаємодії бактерій та рослин дуалістична. З одного боку, білки, що транспортуються за допомогою цієї системи, мають сигнальні властивості щодо клітин рослин, можуть придушувати захисні системи та/або змінювати фізіологію господаря в потрібному для патогену напрямку, що сприяє розвитку інфекції. З іншого боку, ССЗТ-транспортні білки можуть розпізнаватися у рослинних клітинах як сигнал небезпеки, що індукує дуже потужна захисна відповідь - реакцію гіперчутливості, і таким чином перешкоджати інфекційному процесу. У зв'язку з цим гени, що кодують компоненти ССЗТ, а також ефектори та харпіни, у фітопатогенів отримали назву hrp (hypersensitive response and pathogenicity), оскільки мутації у цих

НУБІП УКРАЇНИ

Гени зазвичай призводять до нездатності патогена як викликати захворювання, так та індукувати реакцію гіперчутливості (Chang et al., 2014).

НУБІП УКРАЇНИ

Відмінністю ефекторів від харпінів є те, що перші доставляються в цитоплазму клітин господаря, а другі транспортуються в апопластів. Основна роль у модуляції фізіологічних процесів господаря зазвичай приділяється ефекторам. При цьому харпіни (які також називають хелперними білками) розглядаються як допоміжні дії ефекторів білки. Їх допоміжну роль пов'язують із формуванням пір у плазмалемі господаря, а також полегшенням проходження пилу через рослинну клітинну стінку, оскільки деякі харпіни

мають пектатлазний домен. Однак те, що харпіни самостійно здатні як індукувати, так і блокувати реакцію гіперчутливості господаря, мабуть, свідчить про їхню незалежну від ефекторів дію. Можливо, харпіни здатні

взаємодіяти з рецепторами господаря, що знаходяться на мембрані, але це, як і інші припущення про механізми дії харпінів, потребує експериментального підтвердження (Choi et al., 2013).

Серед фітопатогенних бактерій ССЗТ найбільше охарактеризована у біотрофів, таких, наприклад, як *Xanthomonas campestris* і *Pseudomonas syringae*, і вважається, що вона є ключовим зрядям саме біотрофів, які

взаємодіють із господарем за принципом «хитрість», а не «сила». В теж час ССЗТ описана і у некротрофів (наприклад, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dadantii*). Основна відмінність ССЗТ некротрофів та біотрофів

полягає в кількості виявлених ССЗТ-транспортованих білків: у біотрофів – це десятки, а некротрофів – одиниці. Проте роль ССЗТ у вірулентності

експериментально доведено обох цих груп рослинних патогенів. Однак залишається, як і раніше, не зовсім зрозумілим, яким чином ця система для делікатного впливу на регуляторні системи рослини допомагає колонізувати

господаря некротрофним фітопатогенам, які продукують безліч ферментів, що руйнують тканини господаря, та токсинів, що вбивають клітини рослин.

Ймовірно, що ССЗТ необхідна некротрофам на початковій стадії колонізації рослини-господаря, поки щільність бактеріальної популяції не збільшиться

до рівня, що забезпечує достатнє виробництво ферментів та токсинів (Büttner, He, 2009; Büttner, 2012).

Система ССЗТ має багато спільного з будовою джгутикового апарату, що вказує на філогенетичну близькість цих двох систем. ССЗТ різних мікроорганізмів складаються з приблизно 20-30 білків, які є компонентами

наступних основних структур: 1) базального комплексу або базального тіла; 2) піля (каналу) та 3) транслокону.

Базальний комплекс пронизує внутрішню та зовнішню мембрани та зовні нагадує муфту, яка складається з кількох кілець та центрального

стрижня. Базальний комплекс бере участь у захопленні білків із цитоплазми та їх переміщенні в пил. Пиль, що складається з білка пілна, є порожнистим каналом, що виступає з базального тіла. За межі клітини, яким

транспортуються секретуєміе білки. Нуклеотидні послідовності генів пілін дуже варіабельні не тільки у різних родів та видів, але навіть підвидів, а подібність цих білків визначається їхньою доменною організацією (Weber, Koebnik, 2006). У пілін виділяють С-кінцевий домен для полімеризації та N-кінцевий сигнальний домен, необхідний для секреції даного білка через пил.

Таким чином, пілін сам секретується через ССЗТ та полімеризується на вершині пилля. Транслокон, що знаходиться на кінці пилля, необхідний для контакту з мембраною клітини господаря і формування в ній пори через яку до цитоплазми доставляють ефекторні білки (Green, Meesaq, 2016)

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Бактеріальні штами та ізоляти

Два штами *P. syringae* pv. *syringae* (PPS13 та PPS15) використовувалися у цьому дослідженні. PPS15 було отримано з бактеріальної колекції. Штам PPS13 був виділений з листків гречки посівної в Київській області. Ідентифікацію бактеріальних штамів проводили за допомогою біохімічних тестів (LOPAT та GATTA) та шляхом порівняння послідовностей гена 16S рРНК з базою даних GenBank з використанням інструменту пошуку базового вирівнювання (BLAST). Патогенність штаму PPS13 була підтверджена на рослинах гречихи, інкульованих 10⁸ КУО мл⁻¹ бактеріальної суспензії і порівняли з еталонним штамом PPS15. Симптоми, характерні для бактеріальної плямистості. Некротичні ділянки розвивалися та збільшувалися.

Три бактеріальні ізоляти (BAC2, BAC3 і BAC5), які показали свою антагоністичну дію по відношенню до патогену, ідентифіковані біохімічним тестом і відповідають *Bacillus* spp., були отримані з безсимптомного листа

гречихи. Антагоністичну дію цих бактеріальних ізолятів було доведено тестами *in vitro* та *in vivo*.

2.2. Зберігання та одержання часнику

Цибулини часнику *Allium sativum* купували в супермаркеті та зберігали при 4°C у темряві доти, доки не знадобилося. Пахові бруньки складеної цибулини часнику очищали від шкірки, зважували і грубо подрібнювали. Сік часнику отримували шляхом віджиму суміші мацератів з використанням стерильної марлі. Сік центрифугували при 4200 об/хв протягом 10 хв, щоб відокремити залишки часнику від рідини, і фільтрували шприцевим фільтром (0,22 мкм). Екстракт часнику використовували або відразу, або зберігали при 4°C до використання.

2.3. Аналіз екстракту часнику на вміст аліцину

Вміст аліцину визначали спектрофотометрично (Jenway 7315) щодо реакції з тіолом, 4-меркаптопиридином. Екстракт часнику інкубували з 4-меркаптопиридином (10⁻⁴ М) у фосфатному буфері (50 мМ), ЕДТА (2 мМ, рН 7,2), що призводило до утворення змішаного дисульфідну, 4-алілмеркаптопиридину і подальшому поглинання при 324 нм контролювали як описано Miron et al. (2002). Негативний контроль отримано з використанням тієї ж процедури без екстракту часнику.

2.4. Виділення та ідентифікація бактерій-антагоністів

2.4.1. Виділення бактерій-антагоністів

Під час досліджень зразки були зібрані із посівів гречихи. Молоде здорове листя (було взято по 10 листків на рослину з кожної ділянки). Листя промивали стерильною дистильованою водою. Кожен зразок було розрізано на дрібні шматочки (приблизно 2×2 мм), а потім фрагменти дезінфікували поверхню 95% етанолом протягом 3 хвилин. Шматочки тканин поміщали в стерилізовану воду і механічно подрібнювали у стерильній ступці. Потім

були зроблені серійні розведення. Петлю мацерату наносили штрихами на чашки Петрі, що містять середовище LB (Luria-Bertani), і інкубували при 25 °C протягом 3 діб.

2.4.2. Ідентифікація бактерій-антагоністів

Тест гідроксиду калію (KOH) 3%

Ідентифікація антагоністів здійснювалася з допомогою біохімічних тестів. Експрес-метод (KOH) для визначення реакцій за Грамом бактерій був здійснений, як описано Suslow et al. (1982). Бактерія була асептично видалена

з чашок Петрі за допомогою зубочистки, поміщена на предметне скло в краплі 3% розчину KOH і переміщувалась протягом 10 зі швидким круговим рухом руки.

Каталазний тест

Частину колонії переносили на предметне скло за допомогою стерильної зубочистки і змішували з краплею H₂O₂. Утворення бульбашок повітря свідчить про активність каталази, тоді як відсутність бульбашок повітря свідчить про відсутність активності каталази.

Оксидаза

Цей тест визначає наявність ферменту цитохром-С-оксидази. Було використано метод Ковача (1956). Окрему колонію зі свіжозрізаної пластини агару LB відбирали і наносили стерильною зубочисткою на диски, просочені реагентом: N, N, N', N'-тетраметил-п-фенілендіамін. Отримання виразного пурпурового кольору за 10 с було зареєстровано як позитивний результат.

Гіперчутлива реакція (ГР) на рослини тютюну

Щоб переконатися, що бактерії-антагоністи не є фітопатогенними агентами, на листі тютюну (*Nicotiana tabacum*) було проведено тест на гіперчутливість. Бактеріальну суспензію спектрофотометрично доводили до

(10^8 КУО/мл) і вводили в міжклітинний простір листя за допомогою медичного шприца. Контролі, використані в цьому тесті, були негативним контролем (стерильна дистильована вода) і позитивним контролем (штами DAPP-PG115). Відсутність повного руйнування тканини через 24 години реєстрували як негативну реакцію.

2.5. Кількісний аналіз антимікробної активності антагоністичних бактерій щодо *P. syringae*

Двошаровий метод

Антагоністичної активності по відношенню до *P. syringae* pv. *syringae* 21 ізоляту *Bacillus* методики Відавєра (1976) та Стоньє (1960). Для кожного ізоляту готували бактеріальну суспензію (10^8 КУО-мл⁻¹) в стерильній дистильованій воді (SDW); Аліквоти по 20 мкл інокулювали точково на середовище LB та інкубували при 25 °C протягом 48 годин. Того самого дня, як і плями щеплення, два *P. syringae* pv. *syringae* наносили штрихами на тверде середовище King's B і інкубували протягом 2 діб при 25 °C. Потім бактерії-антагоністи піддавали впливу парів хлороформу протягом 30 хвилин, і планшети залишали відкритими на 10 хвилин. Один мілілітр бактеріальної суспензії патогену (10^8 КУО мл⁻¹) змішували з 3 мл середовища LB (0,6% агар) при 45 °C. Цей розчин швидко покривали чашки, що містять антагоністи. Планшети інкубували при 25 °C і через 24-48 год перевіряли на появу інгібованих ореолів, що оточують плями антагоніста.

Метод дифузії у лунках агару

Здатність антагоніста продукувати дифузні метаболіти також тестували відповідно до аналізу дифузії в лунках агару (AWDA), як повідомили Tagg і McGiven (1971). Найбільш потенційно антагоністичні бактеріальні ізоляти переносили окремо в 50 мл бульйону Дурія-Бєргані (бульйон LB) в 250-мл колбі Ерленмейєра і інкубували струшуванням при 200 об/хв протягом 4 діб при кімнатній температурі (RT). Бактеріальні суспензії (1 мл; 10^8 КУО мл⁻¹)

з двох *P. syringae* pv. *syringae* змішували з 3 мл середовища LB (0,6% агар) при 45 °С. Цей розчин швидко наносили на чашки, що містять середовище LB, а потім пробивали лунки в агарі стерильним сталевим свердлом.

Потенційні антагоністичні культури центрифугували при 15000 об/хв протягом 30 хвилин видалення клітинного дебрису. Після центрифугування 100 мкл кожного зразка асептично фільтрували через фільтр 0,45 мкм і додавали підготовлені лунки. Потім планшети інкубували при 25 °С і вимірювали інгібування ореоли навколо лунок.

2.6. Кількісний аналіз антимікробної активності екстракту часнику

проти *P. syringae* pv. *syringae*

Дисковий дифузійний метод

Метод дифузійного диска (Pereira та ін. 2006) був використаний для визначення чутливості *P. syringae* у бік екстракту часнику. Один мілілітр бактеріальної суспензії (108 КУО мл-1) з *P. syringae* pv. *syringae* ретельно перемішували з середовищем LB і виливали у стерильну чашку Петрі. Були приготовлені та вміщені широкі розведення екстракту часнику, щоб встановити пропорційність залежності між кількістю активної речовини та діаметром зони інгібування. Для цього на поверхню пластин з LB агаром поміщали диск з фільтрувального паперу Whatman (діаметром 6 мм) і поміщали 20 мкл чистого екстракту часнику (100%), 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 і 10%-ві розведення, що містять 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 або 2 мкл екстракту часнику, відповідно, піпеткою наносили на стопку дисків із фільтрувального паперу. Нерозведений екстракт часнику вважали 100% концентрацією екстракту. Як негативний контроль використовували дистильовану воду. Кожен стерильний диск просочений часником різної концентрації. Потім,

Метод дифузії у лунках агару

Середовище LB наливали у кожен стерильну чашку Петрі. Один мілілітр бактеріальної суспензії (108 КУО мл⁻¹) з двох *P. syringae* pv. *syringae* змішували з 3 мл середовища LB (0,6% агар) при 45 °С (Tagg and McGiven 1971).

Цей розчин швидко наносили на чашки, що містять середовище LB, потім лунки діаметром 6 мм пробивали в агарі стерильним сталевим буром.

Потім лунки пробивали в агарі стерильним сталевим буром. У підготовлені лунки додавали асептично сто мікролітрів екстракту часнику. Потім

планшети інкубували при 25 °С і вимірювали інгібування ореоли навколо лунок. Усі експерименти проводилися у трьох повторностях і повторювалися двічі за часом.

2.7. Аналіз антимікробної активності екстракту часнику та антагоністичних бактерій *in vivo* проти розвитку хвороби

Відібрані штами, що показують найкращий у пробірці антагоністичних рівнів активності проти *P. syringae*. У цьому дослідженні штами *Bacillus* та нерозведений екстракт часнику оцінювалися *in vivo*. Рослини були збережені

всередині теплиці в окремих горщиках, заповнених з підкладкою, що складається з торфу та піску (2/3 об, 1/3 об). Для кожної обробки

використовували дванадцять рослин. Рослини було пошкоджено на шести ділянках стебла. Кожне місце рани засівали 10 мкл бактеріальної суспензії

108 КУО/мл штамів *P. syringae*. Через три дні після інокуляції додавали 10 мкл

стерильної дистильованої води (контроль) або суспензію антагоністичних бактерій *Bacillus*, неочищений екстракт часнику або сульфат міді (0,5%, 0,05 мг/10 мкл SDW) на рани, які потім покривали Parafilm.

Вимірювання ступеня некрозу стебла проводили через 10 тижнів після інокуляції.

2.8. Статистичний аналіз даних

Дані піддалися дисперсійному аналізу з використанням програмного забезпечення IBM SPSS Statistics (версія 23). Середні значення серед обробок порівнювали за допомогою тесту множинних діапазонів Дункана на рівні значущості 5% (P=0,05).

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Характеристика бактеріальних ізолятів

З некротизованих листків виділяли чисті культури бактерій, які утворювали білуваті, напівпрозорі бактеріальні колонії, які флуоресціювали на середовищі Кінга В через 48 годин інкубації. Усього було відібрано 43 окремі бактеріальні колонії та очищено на SNA для подальшого аналізу (табл. 3.1). На SNA ізоляти утворювали великі (2-3 мм у діаметрі), опуклі (леван-позитивні), кремово-білуваті, слизові колонії 2-3 DAT.

Таблиця 3.1

Фізіолого-біохімічні властивості ізолятів роду *Pseudomonas*

Ознака	Ізоляти роду <i>Pseudomonas</i>			<i>P. syringae</i> за Berge
	<i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	
Забарвлення за Грамом	-	-	-	-
Рухливість	+	+	+	+
Форма клітин	П	П	П	П

Спороутворення	-	-	-	-
Флуоресцюючий пігмент	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+
Розрідження желатини	+	+	+	+
Відновлення нітратів	+	+	+	+
Утворення індолу	-	-	-	-
Утворення сірководню	-	-	-	-
LOPAT-тест				
Оксидаза	-	-	-	-
Аргініндигідролаза	-	-	-	-
Пектолitiчна активність	-	-	-	-
Утворення левану	+	+	-	+
Реакція надчутливості на пітоні	+	+/-	+	+
Використання джерел вуглецю				
Глюкоза (анаеробно)	-	-	-	-
Глюкоза (аеробно)	+	+	+	+
Сахароза	+	+	-	+
Маноза	+	+	-	X
Арабіноза	+	-	+	X
Сорбіт	+	+	-	+
Інозит	+	+	+	+
Маніт	+	+	+	+
Ксилоза	+	+	+	+
Лактоза	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	X	-
Аргінін	+	+	+	+
Аспарагін	+	+	+	+
Галактоза	+/-	-	-	X
Примітки: «+» – наявність ознаки; «-» – відсутність ознаки; X – штамова варіабельність; «П» – палички.				

Із них 15 ізолятів бактерій, колонії яких сірі, прозорі або напівпрозорі, з плоским або ввігнутих центром, грамнегативні, рухливі, неспороутворюючі, мають флуоресціюючий пігмент, оксидазонегативні, аеробно використовують глюкозу, не утворюють індол та сірководень, були віднесені до роду *Pseudomonas*.

3.2. Ідентифікація бактерій-антагоністів

Антагоністичні бактерії, які мають антибактеріальну активність щодо *P. syringae* pv. *syringae* були ідентифіковані біохімічно. Інфільтрація листя тююну з антагоністичних бактеріальних суспензій не викликає реакції гіперчутливості після 24 годин у листі тююну, тоді як *P. syringae* pv. *syringae* індукованли гіперчутливу реакцію. Ці результати показали, що використаний бактеріальний агент був патогенами рослин. Штами потенційного антагоністичного агента показали морфологію бактеріальних колоній, характерну для *Bacillus*. Штами були грам (-), оксидаза (-), (HR-) та каталаза (+). Згідно з макроскопічними характеристиками колоній бактеріальних штамів, а також біохімічними характеристиками, антагоністичні бактеріальні штами належать до роду *Bacillus* відповідно до ключів De Vos et al. (2009).

3.3. Антимікробна активність антагоністичних бактерій щодо

P. syringae pv. *syringae*

Двошаровий метод

Аналіз варіації зони інгібування показав дуже значні відмінності між бактеріальними обробками ($P=0,05$). З 74 штамів 21 виявив антибактеріальну активність щодо збудника. Антагонізм 21 *Bacillus* ізолят був досліджений щодо двох штамів *P. syringae* pv. *syringae* (PPS15 та PPS13). Антимікробна активність (мм) виражається як різниця між діаметром зони інгібування та діаметром колонії *Bacillus* (табл. 3.2). Результати тестів на двошаровий

антагонізм показали значний інгібуючий ефект. Бацили штаму ВАС2 показав найвищу зону інгібування зі значеннями 20,66 та 22 мм проти PPS13 (рис. 3.1) та PPS 15, відповідно (табл. 3.2). Крім того, *Bacillus* spp. штаму

ВАСGCI показав низьку антагоністичну активність. Діаметр зон інгібування становив 6,1 та 5,6 мм для PPS15 та PPS13 відповідно. Деякі дослідження показали, що різниця в ефективності *in vitro* була пов'язана зі змінами в природі та концентрації секретованих метаболітів, таких як антибіотики (Defago і Haas, 1990), літичні ферменти та сидерофори (Bakker et al. 1990).

Таблиця 3.2

Діаметр зони інгібування (мм) індукованої *Bacillus* spp. проти *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Антагоністи (<i>Bacillus</i> spp.)	Фітопатогенні бактерії	
	Діаметр зони інгібування (мм)	
	PPS13	PPS15
ВАС2	20,66 ± 0,1	22 ± 0,1
ВАСL2	18 ± 0,09	18,4 ± 0,09
ВАСТ1	16 ± 0,08	16,35 ± 0,05
ВАС3	15,7 ± 0,05	16,33 ± 0,05
ВАСТ3	14,68 ± 0,05	15,1 ± 0,1
ВАСП1	13,66 ± 0,05	14 ± 0,08
ВАСНТ1	11,66 ± 0,05	12,33 ± 0,09
ВАСL1	11,68 ± 0,13	12,16 ± 0,1
ВАСТ2	10,66 ± 0,08	11,33 ± 0,11
ВАСК2	11 ± 0,09	12,16 ± 0,07
ВАСМ2	10,85 ± 0,05	11,85 ± 0,05

Антагоністи (<i>Bacillus</i> spp.)	Фітопатогенні бактерії	
	Діаметр зони інгібування (мм)	
	PPS13	PPS15
BACK3	10,66 ± 0,1	11,7 ± 0,04
BACCI1	10,68 ± 0,048	11,5 ± 0,1
BACBT1	10,6 ± 0,053	11,55 ± 0,09
BACTCK1	10,66 ± 0,10	11,33 ± 0,05
BACM4	6,66 ± 0,13	7,2 ± 0,16
BACM3	6,68 ± 0,13	7,01 ± 0,04
BACTM1	6,33 ± 0,15	6,83 ± 0,07
BACHT2	5,83 ± 0,09	6,33 ± 0,05
BACL3	5,85 ± 0,07	6,18 ± 0,04
BACGCI	5,66 ± 0,05	6,16 ± 0,04

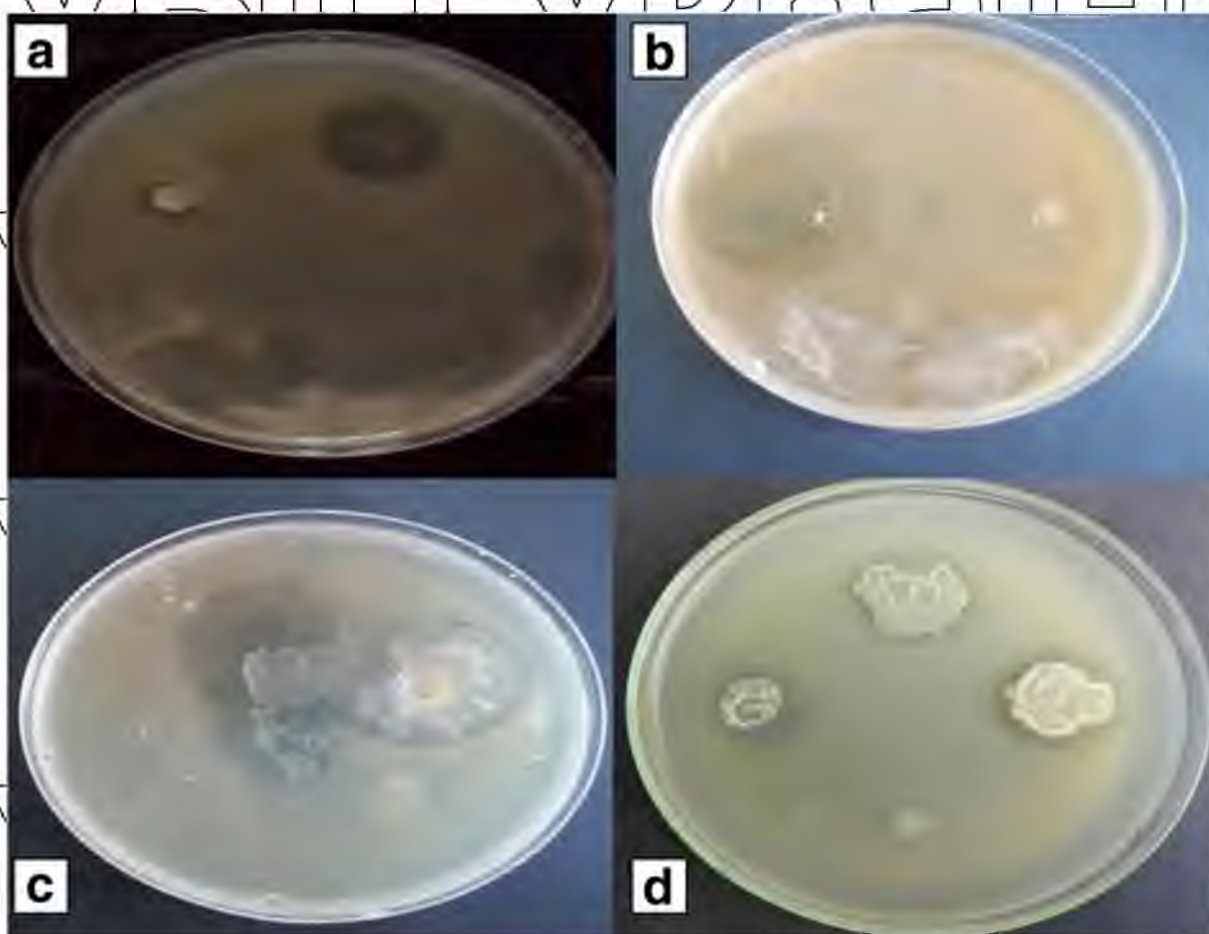


Рис. 3.1. Зони інгібування, індуковані *Bacillus* spp. проти *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* штам PPS13: а (BACL3), б (BACL2), в (BACL2), д (BACT1). (Негативний контроль): іштами, виділені з листя гречихи.

Метод циліндрів з агаром

Результати аналізів дифузії в лунках агару показали, що штам BACL2 виявляв зону інгібування 17 мм і 18 мм проти PPS13 та PPS15 відповідно.

Для сульфату міді відповідний діаметр зони інгібування становив 20,66 та 23 мм для PPS13 та PPS15. Таким чином, результати показали, що супернаганти антагоністичних бактерій мали антагоністичну активність нижче 1% сульфату міді.

Дослідження Nielsen and Sorensen (1997) показали, що різні пологи бактерій вважаються продуцентами антибіотиків чи гідролітичних ферментів. В основному бактерії належали до роду *Bacillus*. Фактично, види *Bacillus* виробляють вторинні метаболіти, такі як антибіотики, літичні ферменти (Fraudberg and Schumier 1994), а також леткі та нелеткі сполуки (Parke and Gurian-Sherman 2001).

3.4. Антимікробна активність екстракту часнику проти *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Дисковий дифузійний метод

Екстракт часнику містив близько 13,4 мг/мл аліцину, як визначено спектрофотометрично. Діаметр зони інгібування, за дії 20 мкл екстракту часнику при концентрації від 10% до 100%, варіював від 6 до 14 мм і від 7 до 15 мм для PPS13 та PPS15 відповідно (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Діаметр зони інгібування (мм), за дії екстракту часника проти

Pseudomonas syringae pv. *syringae*

Штами

Розведення екстракту часника (%)

	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
PPS13	0	6	8	10	10,35	10,5	11,33	11,66	11,83	13	14
		± 0,06	± 0,08	± 0,06	± 0,05	± 0,05	± 0,08	± 0,08	± 0,09	± 0,06	± 0,06
PPS15	0	7	9	10,5	11	11,2	12,16	12,33	12,85	14	15
		± 0,1	± 0,06	± 0,08	± 0,09	± 0,09	± 0,04	± 0,08	± 0,07	± 0,1	± 0,06

Після внесення 20 мкл неочищеного екстракту (приблизно 268 мкг

аліцину в 20 мкл) або 20 мкл розведень екстракту на чашці Петрі з'явився

чіткий інгібований ореол, і ріст штамів (PPS13 та PPS15) стригнічувався

часником. Екстракт поміщають на чашки із засіяним агаром (рис. 3.2А та

В). Результати показали наявність позитивної кореляції між збільшенням

концентрації екстракту часнику та діаметром зони інгібування. Розмір ореолу

інгібування був пропорційний кількості нанесеного екстракту часнику і

показав лінійну залежність при побудові графіка проти логарифму діаметра

зони інгібування (рис. 3.3А і В). Коефіцієнт детермінації становив 0,83 для

PPS13 та 0,88 для PPS15.

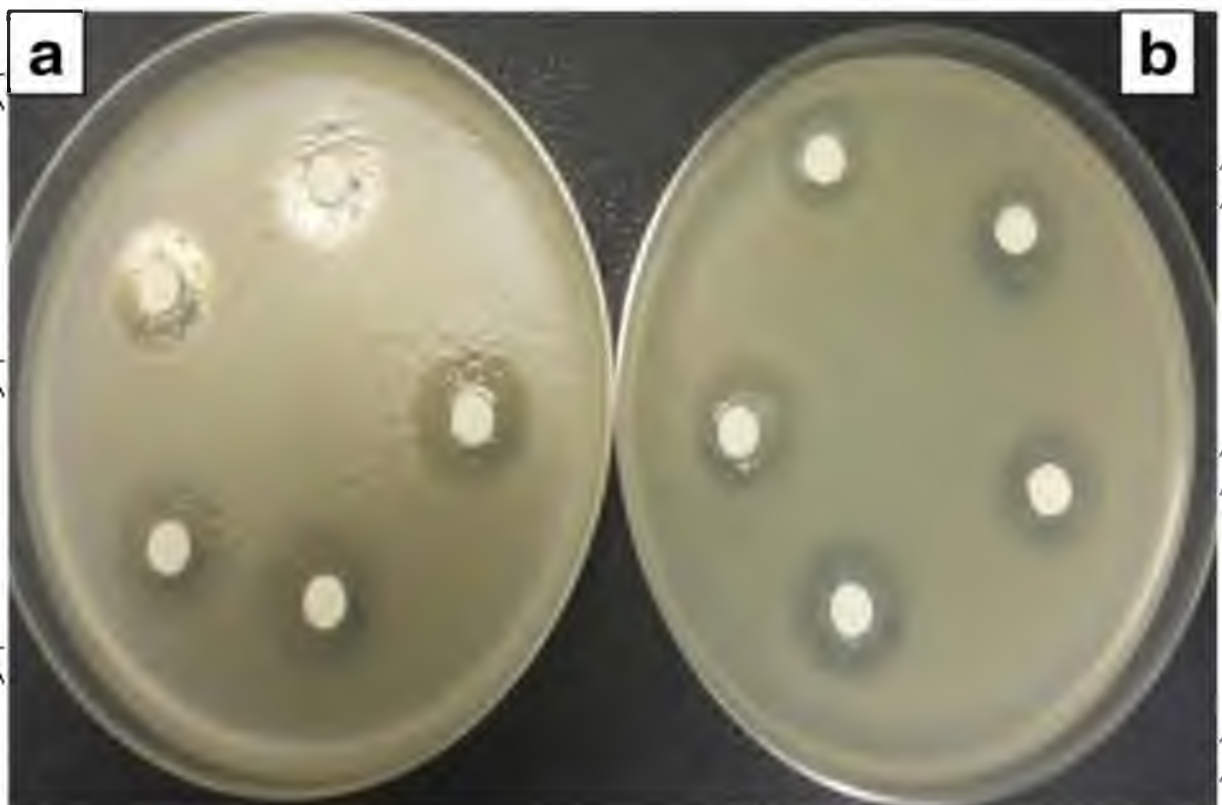


Рис. 3.2. Антибактеріальна активність екстракту часнику, оцінена методом дискової дифузії щодо PFS 5 (a) та PPS13 (b).

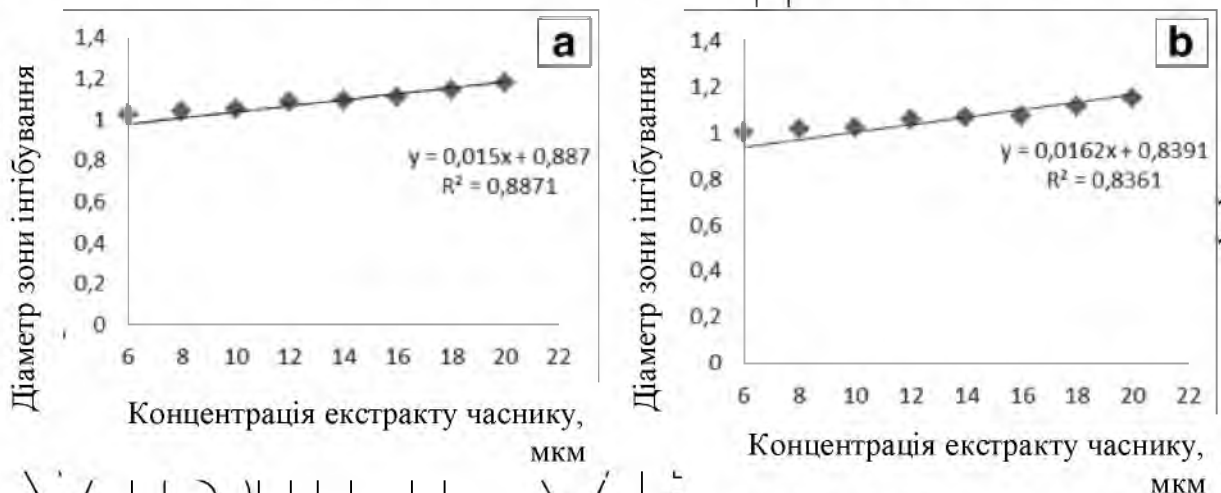


Рис. 3.3. Графік регресії логарифму діаметра зони інгібування на PPS15 (a) та PPS13 (b) залежно від об'єму екстракту часнику, розведеного до 20 мкл.

Miron et al (2000) повідомили, що екстракт часнику має широкий спектр антибактеріальної активності проти грамнегативних та

грампозитивних бактерій. Нещодавно повідомлялося, що алліцин і його

препарати часнику виявляють антибактеріальні властивості в широкому

спектрі, і ці бактерії включають *Aeromonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*,

Cryptocaryon spp., *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*,

Mycobacterium spp., *Photobacterium spp.*, *Preteus spp.*, *Pseudomonas spp.*,

Salmonella spp., *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio spp.*,

Agrobacterium tumefaciens, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* and

Xanthomonas campestris (Guo et al. 2015).

Метод дифузії у лунках агару

Дисперсійний аналіз показав, що результати, досягнуті в присутності

різних обробок росту бактерій, показали дуже значний ефект. Результати

тесту дифузії в агарі показали, що екстракт часнику (приблизно 1,34 мг

аліцину (100 мкг) виявляє антибактеріальну активність проти патогену. Дане дослідження показало, що екстракт часнику був найефективнішим лікарським засобом проти *P. syringae* pv. *syringae* штампів (PPS13 та PPS15)

(табл. 3.3, рис. 3.4). Діаметр зони інгібування бактеріями-антагоністами був меншим, ніж у сульфату міді. Таким чином, екстракт часнику виявився більш ефективним, ніж сульфат міді 1% проти *P. syringae*.

Попередні дослідження повідомили, що *A. sativum* виявляє активність проти багатьох патогенних бактерій і грибів з різною швидкістю (Ankri and Mirelman 1999; Pyun and Shin 2006, and Saravanan et al. 2010). Ефективність екстракту часнику проти ряду патогенних організмів рослин була продемонстрована пригніченням росту патогенних бактерій рослин *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *tomat*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Curtis et al. 2004).

Таблиця 3.4

Антибактеріальна активність екстракту часнику, *Bacillus* spp. та сульфат міді проти PPS13 та PPS15

Речовина	Фітопатогенні бактерії	
	PPS13	PPS15
	Агар дифузійний	
ВАСТ1	13,33 ± 0,05	13,5 ± 0,08
ВАСЛ3	14 ± 0,05	14,33 ± 0,12
ВАСФСЛ2	15,5 ± 0,12	15,83 ± 0,11
ВАСЛ2	17 ± 0,1	18 ± 0,09
Екстракт чеснока	24,66 ± 0,13	32,83 ± 0,15
ВАССТ1	13,83 ± 0,11	14,16 ± 0,09
Мідний	20,66 ± 0,1	23 ± 0,08

Речовина	Фітопатогенні бактерії
купорос 1%	Агар дифузійний

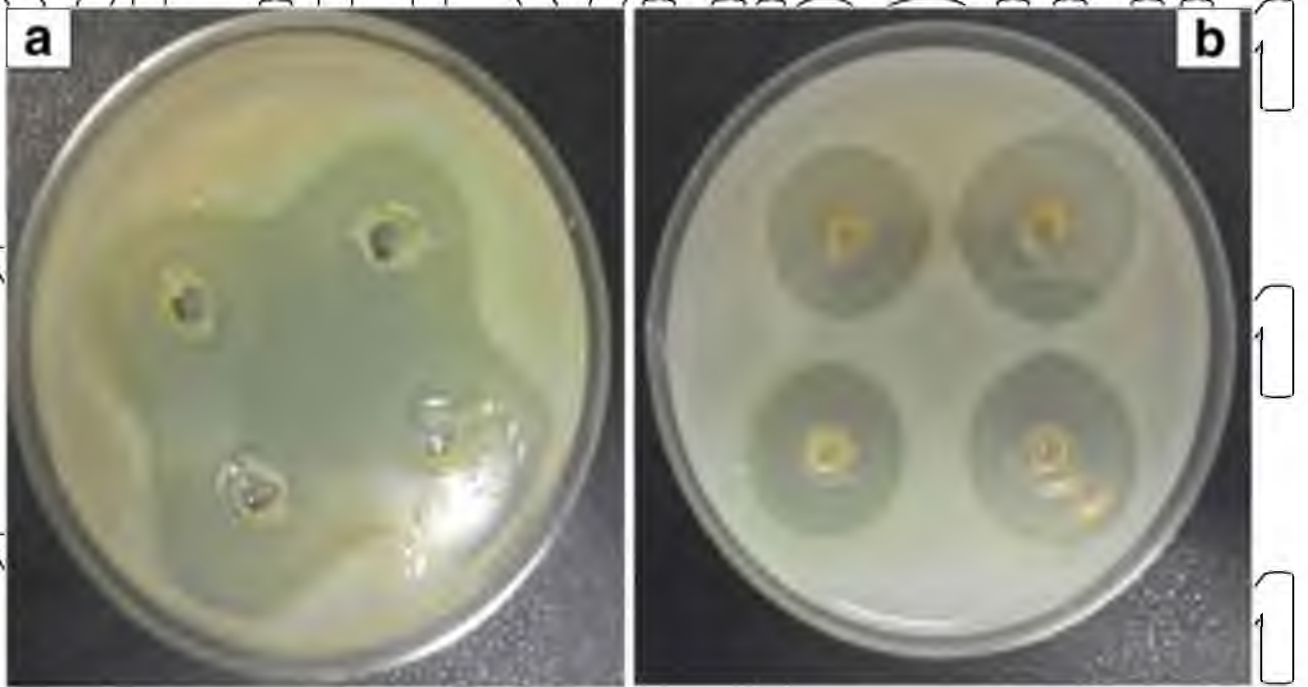


Рис. 3.4. Зони пригнічення, викликані екстрактом часнику проти *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* штами PPS15 (а) та PPS13 (б)

Тікі та ін. (2008) показали, що антимікробні властивості екстракту часнику обумовлені активною молекулою, якою є аліцин. Ця молекула накопичується природно при температурі навколишнього середовища під час зберігання цибулин часнику (Amagase et al. 2001). Алліцин легко проникає через клітинну мембрану та вступає в реакції тіол-дисульфідного обміну з вільними тіоловими групами в білках. Вважається, що ці властивості лежать в основі антимікробної дії (Miron et al. 2000). Дія біологічно активного інгредієнта аліцину, який виявляє свою антимікробну активність в основному за рахунок негайного та повного інгібування синтезу РНК, хоча синтез ДНК та білків також частково інгібується, що дозволяє припустити, що РНК є основною мішенню дії аліцину (Deresse 2010).

3.5. Антимікробна активність екстракту часнику та бактерій-антагоністів щодо розвитку бактеріозу на рослинах гречки *in vivo*

Отримані результати довели, що *Bacillus* spp. штами BACL3, BACFCL2 та BACL2 зменшували тривалість розвитку бактеріозу, викликаного штамми (PPS13 та PPS15). Дисперсійний аналіз показав дуже значний ефект лікування порівняно з контролем ($P=0,05$). Типовий бактеріоз з'являвся на інокульованих ділянках штамом PPS13, показуючи середню довжину некрозу стебла 11 мм та 9,7 мм для штаму PPS 15. Бацили штаму BACL2 зменшували середню довжину ураження на 56,11 та 62,5% для штамів PPS 13 та PPS 15 відповідно. Коли штам BACFCL2 був доданий до ран, інокульованих штамом PPS13 або PPS15, було відзначено зменшення середньої довжини ураження листя зі значеннями 50,13 та 55% відповідно. Крім того, штам виду *Bacillus* BACL3 зменшував середню довжину ураження на 53,88 та 61,66% для PPS13 та PPS15 відповідно. Однак сульфат міді призвів до зниження цього параметра на 45,83 та 46,38% для PPS13 та PPS15 відповідно. Ці результати показали, що екстракт часнику був найефективнішим засобом боротьби з патогеном. Екстракт часнику зменшував середню довжину ураження на 60,55 та 70,83% для ізолятів PPS13 та PPS 15 відповідно (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.
Вплив різних обробок на розвиток бактеріозу

Обробка	Фітопатогенні бактерії			
	PPS13		PPS15	
	Ореал ураження (мм)	% зниження	ореал ураження (мм)	% зниження
Екстракт часника	4,5	60,55	2,6	70,83
BACL3	5,2	53,88	3,5	61,66
BACFCL2	5,5	50,13	4,5	55

Обробка	Фітопатогенні бактерії			
	PSS13	% зниження	PSS15	% зниження
	Ореал ураження (мм)		ореал ураження (мм)	
BACL2	5	56,11	3,5	62,5
Сульфат міді	6	45,83	5,1	46,52
контроль	11	0	9,7	0

Біологічний контроль *P. syringae* pv. *syringae*, збудник в умовах in vitro та in vivo, не вивчався. Експерименти in vivo показали, що бактеріоантагоністи (BACL3, BACFCL2 та BACL2) зменшували розвиток бактеріозу.

Шафи та ін. (2017) зазначили, що використання та кількість антагоністично важливих видів *Bacillus* дуже швидко збільшується. Види *Bacillus* мають унікальну здатність до швидкого розмноження, стійкі до несприятливих умов навколишнього середовища, а також мають широкий спектр можливостей біологічного контролю. *Bacillus* spp. відіграють пряму роль у стійкості до фітопатогенних організмів за рахунок виробництва позаклітинних антимікробних антибіотиків, токсинів, гідролаз та ліпопептидів (Bardin et al 2015).

Види *Bacillus* синтезують різні типи ліпопептидів на основі вторинних метаболітів зі специфічною активністю проти патогенів рослин, що надає їм унікального значення в сільському господарстві, біотехнології та фармацевтичній промисловості. Було ідентифіковано близько 2428 антимікробних пептидів різних організмів, таких як бактерії (237), археї (2), протисти (7), гриби (12), рослини (310) та тварини (1819). Серед них 756 таких пептидів мають різний ступінь протигрибкових властивостей. Механізми, за допомогою яких мікроорганізми призводять гриби до загибелі, включають закупорку, відволікання та утворення дірок у клітинній стінці та

клітинних мембранах грибів. Також деякі пептиди беруть участь у розпаді внутрішньоклітинних органів грибів, таких як нуклеїнова кислота та мітохондрії. Крім виробництва різних поверхнево-активних речовин, види

Bacillus синтезують безліч сильнодіючих амфифільних та поверхнево-активних ліпопептидів, включаючи баціломіцини, ітурини та мікосубтилін;

за зміни умов культивування ці бактерії також продукують фенгіцини або пліпастатин. Характеристика, заснована на існуванні L- D-амінокислот та

регульованих гідрофобних дослідженнях, показала, що всі вони поділяються

на дві категорії: циклічні пептиди (ітурини) та макролактони (пліпастатини, фенгіцини та сурфактини). Ітурініки викликають витік клітин, вставляючи свої гідрофобні хвости в цитоплазматичну мембрану і за допомогою аутоагрегації, створюючи пори клітинної мембрани.

Було доведено, що багато антибіотиків, що продукуються *Bacillus subtilis*, мають широкий спектр (Vanneste 2000), наприклад, глікопептид, який

відіграє роль у стимуляції росту рослин. Повідомлялося, що деяке *B. subtilis* можуть ефективно пригнічувати хворобу в'янення *Ralstonia* у декількох рослин-господарів (Aliye et al. 2008 та Ji et al. 2008).

Крім того, комерційний біофунгіцид, Серенада, яка містить *B. subtilis* в якості активної сполуки, як повідомляється, ефективний проти багатьох патогенних бактерій, включаючи штами *Erwinia*, *Pseudomonas* та *Xanthomonas*. Механізм цього антибактеріального ефекту є невизначеним,

хоча відомо, що *B. subtilis* може продукувати безліч антибактеріальних агентів, включаючи широкий спектр ліпопептидів, таких як сурфактин, які є потужними біосурфактантами (Peuroix et al. 1999).

Крім антагоністичного механізму видів *Bacillus*, ці мікроби також відіграють важливу роль у стимулюванні росту рослин за рахунок посилення

біосинтезу рослинних гормонів (гіберелової кислоти (GA3) та індол-3-оцтової кислоти (IAA)), які мають тісний зв'язок з доступністю поживних речовин для рослин. Види *Bacillus* відіграють важливу роль у стимулюванні росту рослин. Коли суперечки або суспензії клітин *B. subtilis* OTRB1

наносили на насіння томатів у пластиковому горщику, він значно посилював зростання пагонів та коренів, силу проростків та площу листя рослини томату. Більш високий рівень гормонів, що сприяють росту рослин (GA3 та IAA), і пов'язаних із захистом ферментів (пероксидази (PO), поліфенолоксидази (PPO) та супероксиддисмутази) був виявлений у оброблених рослин порівняно з необробленими рослинами.

Багато вчених обговорювали, що *B. subtilis* має здатність стимулювати зростання та врожай рослин за рахунок збільшення поглинання поживних речовин за рахунок збільшення виробництва рослинних гармонік та зниження вироблення етилену, що сприяє колонізації коренів бактеріями.

IAA відіграє важливу роль у виникненні та появі додаткових коренів. Він також посилює розвиток пагонів, впливаючи на експресію, поділ та диференціювання клітин. GA3 грає свою роль у поєднанні з ауксином для

подовження росту рослин та формування листових бруньок. Ці гормони, що сприяють росту рослин, збільшують здатність рослини засвоювати поживні речовини і допомагають рослинам захищатися від різних біотичних та абіотичних стресів. Було продемонстровано, що розведений культуральний фільтрат *B. amyloliquefaciens* значно посилював зростання проростків

кукурудзи. Хімічний аналіз супернатанту FZB42 показав наявність речовин, здатних реагувати з IYK-специфічними антигілами.

Jiang та ін. провели скринінг 100 бактеріальних штамів на предмет їх антагоністичної та стимулюючої зростання активності та виявили, що штам *B. amyloliquefaciens* 54 значно збільшує зростання рослин за рахунок збільшення вмісту в них NPK та хлорофілу. Він також підвищував рівень стійкості рослин до бактеріальної плямистості плодів гарбузових культур за рахунок активації пов'язаного із захистом гена PR1 та накопичення H₂O₂ у тканинах рослин.

Цинк солубілізації, зростання врожаю, біології ґрунту та мобілізації цинку доречність з *B. subtilis* MDSR7, MDSR11 та MDSR14 оцінювали в лабораторних умовах. Більш високий вміст розчинного цинку та збільшення

загальної кількості органічних кислот спостерігалися там, де були інкульовані MDSR7 та MDSR14. MDSR7 та MDSR14 викликають значне зниження рН ґрунту та посилення мікробного дихання, а також β -глікозидазу, дегідрогеназу, продукцію ауксину та мікробну біомасу-С у ризосфері пшениці та сої. Всі штами значно збільшили доступність цинку, який посилює зростання рослин та засвоєння цинку в насінні рослинами пшениці та сої.

Bacillus штам SH1RP8 показав 8% толерантність солоності при нанесенні на піщану дюну завод *Peucedanum japonicum*. При вирощуванні на звичайному ґрунті він збільшував зростання пагонів на 10,9% та на 51,7% сухої маси. Lin та ін. виділили 33 штаму бактерій з ґрунтових відходів. Після перевірки за допомогою самостійно розробленого методу скринінгу він виявив, що всі штами *Bacillus* були сильно антагоністичні восьми грибових патогенів і мали здатність продукувати ІУК, тоді як п'ять штамів виявляли здатність стимулювати зростання рослин.

Wei та ін. оцінили 38 штамів *Bacillus* на наявність антитіл до *Aspergillus parasiticus*. Здатність методом кінцевої культури. Два штами були відібрані за їхні протигрибкові властивості, здатність стимулювати зростання та продукувати фітогормони.

Naip та ін. вивчали штам RM-2 видів *Bacillus* і виявили, що цей бактеріальний штам має багато цінних характеристик, включаючи активність дезамінації ацетил-КоА-карбоксилази (ACC), здатність до солубілізації Р, фунгіцидну активність, активність продукування ІУК і. Забарвлення значно покращили проростання насіння, масу у свіжому та сухому вигляді, площу листя, довжину коренів та пагонів, а також урожай насіння, стручків та зерна порівняно з необробленим контролем.

Valdez та ін. обробляли насіння соняшнику *B. subtilis* для дослідження його впливу на зростання рослин, властивості ґрунту та викиди парникових газів, використовуючи сечовину як позитивний контроль для порівняння. Результати показали, що через місяць довжина коренів, а також свіжа і суха

вага коренів і пагонів були значно вищими, ніж у рослин, оброблених сечовиною. Не спостерігалось суттєвої різниці у продукції CO_2 , тоді як швидкість продукції N_2O була вищою в оброблених бактеріями рослинах у порівнянні з рослинами, залитими сечовиною.

Крім виробництва антибіотиків та виявлення системної резистентності рослини до ряду патогенних захворювань рослин, види *Bacillus* також здатні продукувати ферменти, такі як хітіназа та β -1,3-глюканаз, що мають дуже сильну літичну активність. Ці літичні ферменти, синтезовані видами *Bacillus*, виявилися дуже активними у руйнуванні клітинної стінки грибів.

Проведені дослідження показали, що види *Bacillus* також продукують багато пов'язаних із захистом окисних ферментів, таких як PPO, PO і PAL. Ці окислювальні ферменти індукують лігнін та окислювальні фенольні сполуки, які відіграють роль у перешкодах, пов'язаних із захистом від скорочення, викликаючи структурні зміни в системі клітинного захисту від патогенів рослин. Редіе і Лакхі довели, що PAL відіграє важливу роль в утворенні лігніну та продукції флавоноїдів. Він також відіграє ключову роль у шляху біосинтезу фенілпропаноїдів. Пов'язана із захистом активність ферментів була доведена на різних видах рослин та проти різних патогенів рослин.

Збільшення освіти та активності PAL спостерігалось при впливі на нього бактеріального штаму порівняно з необробленим контролем. Канг і Бухенауер спостерігали посилення фенольної активності в посівах пшениці, викликане індукторами стійкості до борошнистої роси. Фенольні сполуки є

дуже ефективними проти грибових патогенів рослин і, отже, відіграють важливу роль у захисті рослин. Hahlbrock і Scheel повідомили, що PAL відіграє вирішальну роль в утворенні фенольних сполук у рослинах за допомогою фенілпропаноїдного шляху. PPO також відіграє ключову роль активації захисту рослин від різних патогенів рослин. Лі і Стеффенс

повідомив, що генетично модифіковані рослини томатів для збільшення виробництва PPO мають високу стійкість до різних патогенних захворювань. Типьяпонг і Стеффенс спостерігали, що PPO діє як каталізатор в окисних

реакціях фенольних сполук. Було виявлено, що багато представників видів *Bacillus* дуже активні у цих типах активності, що викликає захист.

Основна мета вивільнення гідролази – використовувати поживні речовини, що зберігаються в субстраті шляхом перетворення їх з недоступної форми в доступну. Більш того, бактерії виділяють позаклітинні ферменти у поєднанні з деякими іншими сполуками, щоб подолати конкуренцію з іншими мікробними агентами.

Більшість ґрунтів мають достатню кількість поживних речовин для рослин, але присутні у нерозчинній формі, через що рослини не можуть поглинати ці поживні речовини для свого нормального зростання [101]. β -1,3-Глюканази та хітінази беруть активну участь у захисті рослин від різних патогенів рослин, у той час як PO і PAL беруть активну участь у розпаді фенілпропаноїдів у тканинах рослин.

Ramyabharathi et al. вивчали *B. subtilis* EPCO16 контролю *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Повідомлялося, що рідкий та тілесний склад штаму EPCO16 значно активував пов'язані із захистом ферменти та білки (фенольна ліаза, каталаза та фенілаланін аміак) в інфікованих рослинах томатів. Рідкий склад значно посилив ферментативну активність у рослині томату, а також у насінні, проростках та ґрунті, оброблених EPCO16. Спектрофотометричний аналіз рослин показав, що захисні білки (феноли, PAL та каталаза) досягають максимальних рівнів на сьомий день інокуляції патогену.

Хітінази та глюканази (ламінариназа) гідролітичні ферменти клітинної стінки грибів продукуються деякими гіперпаразитарними видами *Bacillus*. Повідомлялося, що багато штамів *B. subtilis* мають хітинолітичну активність. Podile і Prakash повідомили про хітинолітичний механізм *B. subtilis*.

Хітин посідає друге місце серед полісахаридів за змістом у природі. Це β -1 \rightarrow 4-зв'язаний гомополімер N-ацетил-d-глюкозамін, який є дуже важливим елементом, що зміцнює клітинну стінку грибів, який надає жорсткість клітинній стінці за рахунок водневих зв'язків між сусідніми полімерами. Таким чином, глікозидні зв'язки складових полісахаридів є

основою щільності клітинної стінки грибів. Втручання у зв'язку з цим погіршує клітинну стінку і, отже, витік китин. Види *Bacillus* продукують ферменти, що гідролізують клітинну стінку (хітінази, глюканазі та хітозанази), які ефективно гідролізують клітинну стінку грибкових патогенів.

Отже, ці гідролітичні ферменти мають великий потенціал для лікування грибкових патогенних захворювань рослин. Оскільки в клітинах рослин відсутня хітин, застосування хітінази ефективніше, ніж глюканазі. Бактерії, що продукують хітіназу, з додаванням субстрату хітінази та 1% колоїдного хітину значно зменшували плямистість листя арахісу.

Антимікробна дія природних речовин *A. sativum* екстракт також підтверджено вигрбуваннями в природних умовах на рослинах, інкульованих суспензії *P. syringae*. *A. sativum* виявився найбільш ефективним засобом лікування порівняно з необробленим контролем та сульфатом міді. Крім того, Хасан та Ель-Менеісу (2014) показали, що екстракт часнику зменшив тяжкість захворювання бактеріальної гнилі *Halo* квасолі, викликаній *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

У тому сенсі Balestra et al. (2009) повідомили, що *A. sativum* екстракт знижує частоту захворювань та тяжкості захворювання, викликаного *P. syringae* pv. томат, *Xanthomonas vesicatoria* та *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Було повідомлено, що у природних умовах випробування водних екстрактів *A. sativum* та *Ficus Carica* плоди показали зниження виживання та пошкодження, викликане *P. syringae* pv. *syringae* та бактеріальні патогени ківі *Pseudomonas viridiflava* (Balestra et al. 2008).

Аліцин, один з активних компонентів свіжомелених гомогенатів часнику, має безліч протимікробних властивостей. Було виявлено, що аліцин у чистому вигляді виявляє 1) антибактеріальну активність проти широкого спектру грамнегативних та грампозитивних бактерій, включаючи ентеротоксигенні штами з множинною лікарською стійкістю *Escherichia coli*; 2) протигрибкова активність, особливо проти *Candida albicans*;

3) протипаразитарна активність, включаючи деякі основні кишкові найпростіші паразити людини, такі як *Entamoeba histolytica* і *Giardia lamblia*; та 4) протівірусна активність. Основний протимікробний ефект аліцину

обумовлений його хімічною реакцією з тіоловими групами різних ферментів, наприклад, алкогольдегідрогеназою, тіоредоксинредуктазою та РНК-полімеразою, які можуть впливати на основний метаболізм активності цистеїнових протеїназ, що беруть участь у вірулентності *E. histolytica*.

Крім будь-яких прямих антимікробних ефектів аліцину на патогенні мікроорганізми подорожника можна припустити, що екстракт часнику може містити речовини, які здатні викликати системну набуту резистентність (SAR) у господаря. Таким чином, коли рослини обприскують екстрактом часнику або обробляють аліцином через парову фазу перед інокуляцією патогеном, SAR в організмі господаря може сприяти будь-якому зниженню захворюваності. Стан SAR супроводжується накопиченням молекулярних маркерів, таких як мРНК для білків, пов'язаних з патогенезом, та саліцилової кислоти (Shies et al. 1992).

Дане дослідження є першим, що показує антимікробний ефект екстракту часнику та антагоністичних бактерій *Bacillus* spp. проти *P. syringae* pv. *syringae*, що вражають гречиху. Згідно з цим дослідженням, рослинний екстракт та антагоністичні бактерії (*Bacillus* spp.) можуть бути гарною альтернативою використовуваним фунгіцидам для боротьби з такими захворюваннями.

ВИСНОВКИ

1.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Говоров, Д. Н., Живых, А. В., Новоселов, Е. С., & Голиков, А. Г. (2015). Мониторинг бактериальных и вирусных болезней

сельскохозяйственных культур. Защита и карантин растений, 7, 35–38.

2. Дементьева, М. И. (1988). Болезни плодов, овощей и картофеля при хранении. Москва. Изд-во Рипол Классик.

3. Дякунчак, С. А., Королева, С. В., & Юрченко, С. А. (2017). Создание линий капусты белокочанной, устойчивых к соевидному бактериозу. Рисоводство, 2, 60–64.

4. Ерохова, М. Д., & Дренова, Н. В. (2014). Черная ножка — опасное заболевание картофеля. Защита и карантин растений, 7, 28–30.

5. Захаренко, В. А. (2015). Биотехнологии и защита растений. Защита и карантин растений, 11, 3–6.

6. Игнатов, А. Н., Карлов, А. Н., Джалилов, Ф. С., Карандашов, А., Князькина, М., Корнев, К., & Пехтерева, Э. (2014). Распространение в России черной ножки картофеля, вызываемой бактериями р. *Dickeya*. Защита и карантин растений, 11, 41–43.

7. Игнатов, А. Н., Егорова, М. С., & Ходыкина, М. В. (2015). Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России. Защита и карантин растений, 5, 6–9.

8. Карлов, А. Н., Зотов, В. С., Пехтерева, Э. Ш., Матвеева, Е. В., Джалилов, Ф. С. У., Фесенко, И. А., & Карлов, Г. И. (2010). *Dickeya dianthicola* — новый для России бактериальный патоген картофеля. Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 3, 134–141.

9. Карлов, А. Н., Игнатов, А. Н., Карлов, Г. И., Пехтерева, Э. Ш., Матвеева, Е. В., Шаад, Н., & Варицев, Ю. А. (2011). Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola*. Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 3, 38–48.

10. Колесова, Д. А. (2014). Корневой рак *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn. и косматый корень *A. rhizogenes* (Riker et al.) плодовых деревьев в Центральном Нечерноземье России. Защита картофеля, 2, 61–63.

11. Корнев, К. П., Матвеева, Е. В., Пехтерева, Э. Ш., Политыко, В. А., Игнатов, А. Н., & Пунина, Н. В. (2010). Черная бактериальная пятнистость томатов в России. Защита и карантин растений, 5, 48–49.

12. Котляров, В. В., Дьяченко, А. А., & Котляров, Д. В. (2006). Влияние бактериозов на качество зерна озимой пшеницы. Защита и карантин растений, 12, 25–26.

13. Котляров, В. В. (2008). Бактериальные болезни культурных растений. Краснодар, Изд-во Кубанского ГАУ.

14. Лазарев, А. М., & Борисова, И. И. (2010). Бактериальные болезни картофеля: диагностика и меры борьбы. Сельскохозяйственные вести, 4, 22–24.

15. Лазарев, А. М. (2013). Новый возбудитель бактериоза картофеля атакует российские поля. Защита и карантин растений, 6, 11–15.

16. Лазарев, А. М., Мысник, Е. Н., Игнатов, А. Н. (2017). Ареал и зона вредоносности сердцевинного некроза томата. Вестник защиты растений, 2(92), 59–61.

17. Магомедов, У. Ш., Миронова, М. К., Яковлева, В. А. (2015). Анализ фитосанитарного риска и категоризация вредных организмов. Карантин растений. Наука и практика, 2(12), 8–16.

18. Матвеева, Е. В., Политыко, В. А., & Игнатов, А. Н. (2006). Черный бактериоз зерновых культур: фенотипическая и молекулярная характеристика российских штаммов *Xanthomonas translucens*. Агро XXI, 10–12, 27–30.

19. Пасичник, Л. А., Савенко, Е. А., Буценко, Л. Н., Патыка, В. Ф., & Калиниченко, А. В. (2014). *Pseudomonas syringae* в агрофитоценозе пшеницы. Наука и Мир, 1(4), 52–56.

20. Пилипова, Ю. В., & Шалдяева, Е. М. (2016). Обоснование концептуальной схемы управления фитосанитарным состоянием агроэкосистем картофеля. Вестник НГАУ, 4(41), 19–25.

21. Харламов Д., Игнатов, А. (2001). Наследование устойчивости к сосудистому бактериозу и листовой пятнистости у самонесовместимых линий брокколи. Сельскохозяйственная биология, 5, 50–55.

22. Шнейдер, Е. Ю. (2009). Анализ фитосанитарного риска возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* (Burrill) (Winslow et al.). ФГУ ВНИИКР.

23. Coutinho, T. A., & Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 325–335.

24. Toth, I. K., Van Der Wolf, J. M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., & Elphinstone, J. G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60(3), 385–399

25. Бочков, А. Ф., Афанасьев, В. А., Заиков, Г. Е. (1980). Углеводы. Москва. Изд-во Наука.

26. Горшкова, Т. А. (2007). Растительная клеточная стенка как динамичная система. Москва. Изд-во Наука.

27. Горшкова, Т. А., Козлова, Л. В., & Микшина, П. В. (2013). Пространственная структура полисахаридов растительных клеточных стенок и ее функциональная значимость (обзор). *Биохимия*, 78(7), 1068–1088.

28. Ковтунов, Е. А., Горшков, В. Ю., Гоголева, Ю. Е., Петрова, О. Е., Осипова, Е. В., Нуриахметова, Ч. Б., Гоголев, Ю. В. (2018). Ферменты деградации рамногалактуронана I как факторы вирулентности фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*. *Сельскохозяйственная биология*, в печати.

29. Левина, Е. А., Атыкян, Н. А., Ревин, В. В. (2016). Влияние источников углеродного и азотного питания на биосинтез целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 Д и *Trichoderma viride* ВКМ F-131. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, 1, 85–93.

30. Микшина, П. В., Петрова, А. А., Горшкова, Т. А. (2015). Функциональное разнообразие рамногалактуронанов I. *Известия академии наук. Серия химическая*, 5, 1014–1014.

31. Наумов, Д. Г. (2011). Иерархическая классификация гликозил-гидролаз. *Биохимия*, 76(6), 764–781.

32. Никитина, В. Е., Пономарева, Е. Г., Аленькина, С. А., Коннова, С. А. (2001). Участие бактериальных лектинов клеточной поверхности в агрегации азоспирилл. *Микробиология*, 70(4), 471.

33. Оводов, Ю. С. (2009). Современные представления о пектиновых веществах. *Биоорганическая химия*, 35(3), 293–310.

34. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.

35. Álvarez, B., Biosca, E. G., & López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 267–279.

36. Arantes, V., & Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 4.

37. Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 326–338.

38. Blot, N., Berrier, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Ghazi, A., & Condemine, G. (2002). The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7936–7944.

39. Bonnin, E., Ralet, M. C., Thibault, J. F., & Schols, H. A. (2009). Enzymes for the valorisation of fruit and vegetable-based co-products. *Handbook of Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing*, 2, 257–285.

40. Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900.

41. Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K. H., ... & Manulis-Sasson, S. (2017). Differential contribution of

Clavibacter michiganensis ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 336–346.

42. Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23.

43. Corbett, M., Virtue, S., Bell, K., Birch, P., Burr, T., Hyman, L., ... & Salmond, G. (2005). Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(4), 334–342.

44. Cosgrove, D. J. (2000). New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(1), 73–78.

45. Davidsson, P. R., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, E. T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 4, 191.

46. de Araújo, E. A., Tomazini, A., Kadowaki, M. A. S., Murakami, M. T., & Polikarpov, I. (2013). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new xyloglucanase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(6), 676–678.

47. Driss, D., Bhiri, F., & Chaabouni, S. E. (2012). Cloning and constitutive expression of His-tagged xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6 in *Pichia pastoris* X33: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 83(1), 8–14.

48. Ebringerova, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives — biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556.

49. Fariq, A. (2016). Microbial cellulases: production and applications. *Journal of Biotechnology Science Research*, 3(1), 280696.

50. Feng, T., Yan, K. P., Mikkelsen, M. D., Meyer, A. S., Schols, H. A., Westereng, B., & Mikkelsen, J. D. (2014). Characterisation of a novel endo-

xyloglucanase (XcXGHA) from *Xanthomonas* that accommodates a xylosyl-substituted glucose at subsite. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(23), 9667–9679.

51. Gorshkov, V., Daminova, A., Ageeva, M., Petrova, O., Gogoleva, N., Tarasova, N., & Gogolev, Y. (2014). Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells. *Protoplasma*, 251(3), 499–510.

52. Gorshkov, V. Y., Daminova, A. G., Mikshina, P. V., Petrova, O. E., Ageeva, M. V., Salnikov, V. V., ... & Gogolev, Y. V. (2016). Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels — a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 18(4), 609–617.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України