

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – МР. 1998 «С». 2023.11.01. 07 ПЗ

МАЦЕНКО ЯНИ СЕРГІЙВНИ

2024 р.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 601.2:577.121:632

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету захисту
рослин, біотехнологій та екології

_____ Коломієць Ю.В.

«___» _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

Екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О.Ю.

«___» _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Біологічна активність корневих екзометаболітів *Glycine max* L.
щодо розвитку фітопатогенів за дії біопрепаратів»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

(підпис)

Лісовий М.М.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

д. с.-г. наук, доцент

(підпис)

Бородай В.В.

Виконав

(підпис)

Маценко Я. С.

КИЇВ-2024

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри _____

(науковий ступінь, вчене звання) (підпис) (ПІБ)
“ _____ ” _____ 20 _____ року

ЗАВДАННЯ
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ
РОБОТИ СТУДЕНТУ

Маценко Яні Сергіївні

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: «Біологічна активність кореневих екзометаболітів *Glycine max* L. щодо розвитку фітопатогенів за дії біопрепаратів»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 01.11.2023 р. № 1998 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15.11.2024 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: рослини *Glycine max* L., бактерія *Pseudomonas putida*, фітопатогенний гриб *Fusarium oxysporum*

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Опрацювати і дослідити літературні джерела;
2. Виділити кореневі екзометаболіти рослин *Glycine max* L. за дії мінерально-органічних комплексів та додаткової обробки рослин культуральною рідиною з живими клітинами *Pseudomonas putida*;
3. Дослідити антифунгальну дію водно-спиртових екстрактів сої на ріст фітопатогенного гриба *F. oxysporum*;
4. Дослідити вплив мінерально-органічних комплексів та PGPR-бактерії *P. putida* на біохімічний склад корневих екзометаболітів та листків сої, виокремити потенційні біомаркери серед вторинних метаболітів *Glycine max* L.

Дата видачі завдання 01.09.2023 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота була виконана в навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії на базі кафедри екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України протягом 2023-2024 років.

Робота виконана на 51 сторінці, складається з 3 розділів, містить 11 рисунків, 3 таблиці, 41 використане джерело.

Мета роботи: дослідити вплив сполук вторинного метаболізму сої *Glycine max* L. за обробки органо-мінеральними комплексами та додаткової обробки бактерією класу PGPR *P. putida* на ріст мікроміцета роду *Fusarium*.

Об'єкт досліджень: регуляція біологічної активності екзометаболітів рослин *Glycine max* L. за умов різних методів обробки рослин.

Предмет досліджень: рослини сої *Glycine max* L., бактерія класу PGPR *P. putida*, фітопатогенний гриб *F. oxysporum*, мінерально-органічні комплекси

Методи дослідження: емпіричні (експеримент, спостереження, опис), мікробіологічні (визначення показників росту міцелію гриба), хроматографічні (визначення зв'язку між продуктами вторинного метаболізму за умов різних методів обробки рослин), фотоденситометричні, статистичні.

Актуальність теми: вивчення біологічної активності корневих екзометаболітів сої за дії PGPR-бактерій дозволяє виявити нові механізми захисту рослин від фітопатогенних мікроміцетів. Спільне використання ендоефітних бактерій сої та мінерально-органічних комплексів може стати основою для розробки нових біопрепаратів з високою антифунгальною дією, що є актуальним в умовах набуття патогенами резистентності до хімічних пестицидів. Розробка біопрепаратів сприяє розвитку стійкого сільського господарства та збереженню біорізноманіття.

Ключові слова: соя культурна, *Glycine max* L., PGPR-бактерії, кореневі екзометаболіти, вторинний метаболізм, флавоноїди, *Fusarium oxysporum*.

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ВСТУП | 7 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ | 8 |
| 1.1. Кореневі екsudати <i>Glycine max L.</i> | 8 |
| 1.1.1. Цукри і органічні кислоти..... | 8 |
| 1.1.2. Вторинні метаболіти..... | 9 |
| 1.2. Системи розпізнавання сигнальних молекул рослин грибами..... | 11 |
| 1.2.1. Рецепторна система рослин | 11 |
| 1.2.2. Система інвазійності, вірулентності мікроміцетів | 13 |
| 1.3. Взаємодія рослин і патогена..... | 15 |
| 1.3.1. Набута системна резистентність (SAR)..... | 16 |
| 1.3.2. Індукована стійкість рослин (ISR) | 17 |
| 1.3.3. Патоген-залежні білки в стійкості до грибів..... | 18 |
| 1.4. Взаємодія бактерій класу PGPR і рослин | 20 |
| 1.4.1. Система розпізнавання бактерій рослинами | 21 |
| 1.4.2. Рістстимулюючі та антибіотичні сполуки..... | 21 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ | 24 |
| 2.1. Місце проведення досліджень та обладнання лабораторії..... | 24 |
| 2.2. Приготування поживних середовищ..... | 24 |
| 2.3. Виділення корневих екзометаболітів рослин <i>Glycine max L.</i> | 24 |
| 2.4. Визначення антифунгальної дії метанольних екстрактів вторинних метаболітів рослин | 27 |
| 2.5. Визначення біохімічного складу корневих екзометаболітів та метанольних екстрактів листя <i>Glycine max L.</i> | 27 |
| РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА | 29 |
| 3.1. Вплив вторинних метаболітів листків та корневих екзометаболітів сої на ростові характеристики міцелію ізоляту <i>F. oxysporum</i> | 29 |
| 3.2. Біохімічний склад листків сої <i>Glycine max L.</i> | 34 |
| 3.3. Біохімічний склад корневих екзометаболітів сої..... | 39 |
| ВИСНОВКИ | 45 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ | 47 |
| ДОДАТОК А | 52 |

ВСТУП

Вирощування сої *Glycine max L.* є важливою складовою сільського господарства України і одним із ключових напрямків розвитку аграрного сектору. Інтенсивне використання хімічних пестицидів в агроценозах сільськогосподарських культур порушує природне біорізноманіття, що призводить до виникнення резистентних штамів фітопатогенних мікроміцетів та підвищення їх вірулентності.

Одним з найбільш поширених патогенів сої є *Fusarium oxysporum*, який вражає кореневу систему, листя та стебла рослин протягом повного періоду вегетації. Найчастіше уражаються молоді рослини, що призводить до випадання сходів. Втрати врожаю внаслідок фузаріозу можуть сягати до 20-30%. Фузаріоз також призводить до погіршення якості насіння та накопичення в ньому мікотоксинів, а також до втрати схожості насіння.

Відомо, що бактерії класу PGPR мають здатність синтезувати біологічно активні сполуки, які характеризуються антимікробною дією щодо активності мікроміцетів, а також є індукторами системної стійкості рослин. Таким чином, взаємодія рослин з бактеріями попереджає розвиток хвороб за рахунок пригнічення фітопатогенів шляхом синтезу сполук вторинного метаболізму, які руйнують клітинну стінку грибів та пригнічують їх ріст.

Дослідження впливу бактерій класу PGPR на сільськогосподарські культури рослин відкриває нові перспективи для створення ефективних біопрепаратів, які мають потенціал значно підвищувати врожайність культур, забезпечити надійний захист рослин від фітопатогенів та сприяти накопиченню необхідних поживних речовин у ґрунті. Застосування в агросфері біологічних препаратів дає можливість зменшити використання хімічних фунгіцидів та пестицидів, що сприяє зниженню витрат на вирощування, більш сталому та екологічно безпечному веденню сільського господарства.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Кореневі ексудати *Glycine max L.*

Коренева система рослин синтезує метаболіти в ризосфері двома шляхами: активно шляхом використання енергії АТФ та пасивно, шляхом дифузії. Окрім цього, метаболіти можуть потрапляти у ризосферу в процесі відшарування від основного тіла кореня тканини коренів.

Рослини в залежності від стадії росту та умов навколишнього середовища виділяють низькомолекулярні сполуки- амінокислоти, цукри, фенольні сполуки, терпеноїди та ліпіди, та високомолекулярні сполуки- білки, полісахариди та нуклеїнові кислоти [1].

Більшість метаболітів після виділення в ризосфері швидко розкладаються ґрунтовими мікроорганізмами, але частина з них, особливо спеціалізовані метаболіти, залишаються в ґрунті та обумовлюють біологічну комунікацію [2]. Розподіл цих метаболітів у ризосфері залежить від їх хімічних властивостей, так летючі сполуки мають відносно далеку дистанцію розповсюдження та впливають на рослину в незначних концентраціях.

Кореневі метаболіти відіграють ключову роль у формуванні мікробного середовища навколо коренів, впливаючи на хемотаксис, регулюючи вологість ґрунту, змінюючи його хімічний склад та пригнічуючи ріст інших рослин.

1.1.1. Цукри і органічні кислоти

Виявлено більше 70 метаболітів корневих ексудатів сої, що належать до органічних кислот та амінокислот: адипінова кислота, глюконова кислота, глутарова кислота, гліцерінова кислота, гліцин, L-аланін, L-аспарагін та L-серин [3].

У корневих виділеннях сої були виявлені різноманітні форми цукрів, включаючи глюкозу, пінітол, арабінозу, галактозу, сахарозу, олігосахариди. Дані цукри є потенційним джерелом вуглецю для мікроорганізмів ризосфери.

Осмоліти, такі як пролін та пінітол, були знайдені в корневих екsudатах сої за умов стресу внаслідок посухи [4].

1.1.2. Вторинні метаболіти

Рослини синтезують широкий спектр низькомолекулярних сполук. Ці метаболіти включають різноманітні біоактивні речовини, що використовуються для захисту від біотичних та абіотичних стресів. Окрім цього специфічні сполуки мають здатність стимулювати або пригнічувати розвиток інших організмів. В ході еволюції рослини набувають здатності синтезувати нові метаболіти, які надають їм адаптивних переваг в екосистемах [5].

Більшість водорозчинних сполук належать до речовин фенольної природи, серед яких найбільш активними є феноли. Використовуючи захисні реакції рослин, вони можуть діяти як сигнальні молекули, а також як антиоксиданти. Специфіка дії фенолів визначається розміщенням груп у бензольному кільці: М-феноли здатні стимулювати ростові процеси, а О-феноли і N-феноли- пригнічувати.

Ізофлавоноїди та сапоніни- два класи спеціалізованих метаболітів, які переважають серед корневих виділень сої. Ізофлавоноїди є підгрупою флавоноїдів, які синтезуються за допомогою ізофлавоносинтетази.

Для встановлення симбіотичних відносин корені сої виділяють в ризосферу ізофлавоноїди, такі як дайдзеїн та геністеїн, які слугують сигнальними молекулами для ризобій. За допомогою ізофлавоноїдів рослини сої встановлюють симбіоз з *Bradyrhizobium japonicum* шляхом індукції генів вузлуватості (nod-генів). При цьому вміст дайдзеїну вищий, ніж рівень геністеїну, а стала концентрація в ризосфері підтримується протягом усіх стадій росту сої.

Дайдзеїн служить попередником для біосинтезу гліцеолінів та фітоалексинів, що мають антимікробну активність, і які індукуються при інфікуванні патогенами, такими як *Phytophthora sojae* та *Macrophomina*

phaseolina [6,7]. Ризосферні ізофлавоноїди також відіграють різноманітну роль у біологічній комунікації з ґрунтовими мікроорганізмами. За азотного дефіциту секреція даїдзеїну та геністеїну в ризосферу збільшується приблизно в 10 разів, що призводить до збільшення кількості бульбочкових бактерій. Розраховано, що період напіврозпаду даїдзеїну в ґрунті становить 7,5 днів [8].

Досліджено два шляхи синтезу ізофлавоноїдів у сої: активний транспорт ізофлавоноїдних агліконоів за допомогою АТФ та секреція ізофлавоноїдних глікозидів (можливо зберігаються у вакуолях) в апопласт з подальшим гідролізом глікозидів за допомогою ізофлавонон-кон'югатгідролізуючої бета-глікозидази (ICNG).

Сапоніни- це складні безазотисті сполуки групи глікозидів. Типова структура сапонінів представлена комбінацією гідрофобного аглікону з різними функціональними групами та гідрофільними цукровими залишками, що призводить до поверхнево-активних амфіпатичних сполук. Сапоніни, виконують фізіологічні функції захисту рослин від патогенів, шкідників та травоядних тварин [9]. Існують припущення, що сапоніни бобових можуть діяти як алелохімікати.

Бобові зазвичай синтезують тритерпеноїдні сапоніни, які складаються з агліконоів, сапогенолів та олігосахаридів. Сапоніни сої класифікуються на чотири групи залежно від структури аглікону: глікозиди соясапогенолу А (Група А), глікозиди соясапогенолу В (Група В), глікозиди соясапогенолу Е (Група Е) та глікозиди соясапогенолу В, С22 якого зв'язаний з залишками 2,3-дигідро-2,5-дигідрокси-6-метил-4Н-піран-4-ону (DDMP) [10].

Виявлено наявність сапонінів групи А в корневих виділеннях, тоді як раніше вважалося, що вони присутні лише в гіпокотиллях паростків сої. Основними сапонінами в корневих та листкових тканинах визначено DDMP сапоніни та сапоніни групи Е. Клітини коренів мають механізм сортування, який відбирає молекули сапонінів для синтезу на основі їх структури та

стадій росту, незважаючи на відсутність чіткої переваги щодо структурних особливостей або олігосахаридних залишків кожної групи сапонінів сої. Відносна кількість сапонінів у корневих виділеннях не корелює з їхньою відносною кількістю в корневих тканинах [11].

1.2. Системи розпізнавання сигнальних молекул рослин грибами

1.2.1. Рецепторна система рослин

Для захисту від фітопатогенів рослини розробили дворівневу вроджену імунну систему. Первинний вроджений імунітет активується за допомогою набору визначених рецепторів розпізнавання молекулярних патернів (pattern recognition receptors, PRR), пов'язаних з мікроорганізмами (microbe- or pathogen-associated molecular patterns, M/PAMP). M/PAMP є варіативними молекулами, що мають у складі пептиди та полісахариди, та які розпізнаються переважно в апопласті хазяїна через трансмембранні білки-рецепторні кінази та білки, подібні до рецепторів. Компонент клітинної стінки грибів хітин є яскравим прикладом грибкового M/PAMP.

Після розпізнавання MAMP активуються первинні захисні реакції, які перешкоджають колонізації рослини потенційними патогенами: зміна клітинної стінки шляхом лігніфікації, накопичення калози та захисних білків, включаючи хітинази, глюканази та протеази. Лігніфіковані клітинні стінки є механічно міцнішими та більш стійкими до дії ферментів, що руйнують клітинну стінку, тому лігніфікація може фізично обмежувати патоген. PRR розпізнають певний домен більшої молекули MAMP, який має структурні або ферментативні функції і є специфічними для певного виду патогену [12].

Спроби мікроміцетів проникнути в клітини хазяїна також можуть призвести до активації молекулярних патернів, пов'язаних із пошкодженням (DAMP). DAMP є компонентами хазяїна, що вивільняються та секретуються при пошкодженні клітини або клітинної стінки та сприймаються білками, подібними до PRR, у позаклітинному просторі, що призводить до сигнальної активності [13]. Для грам-негативних бактерій ідентифіковано декілька

МAMP, до яких належать флагелін, ліпополісахарид (LPS) та фактор елонгації Tu (EF-Tu). У деяких рослин ідентифіковано рецепторну кіназу LysM, яка розпізнає хітин грибового походження, та інший рецептор, який розпізнає ооміцетні β -глюкани [14].

Каскад MAPK (mitogen activated protein kinases) є одним найважливіших механізмів сприйняття позаклітинної інформації та активації імунної відповіді рослини при інфікуванні фітопатогеном. MAPK складається з кількох послідовно активованих кіназ, які фосфорилують білки-мішені. Під час взаємодії між фітопатогенними грибами та рослинами грибові MAPK сприяють механічному та ферментативному проникненню в тканини хазяїна, тоді як рослинні MAPK необхідні для активації імунітету рослин.

Мітоген-активовані протеїнкінази- група білків, що діють як ключові компоненти передачі сигналів у грибів, рослин та ссавців. Сигнальні шляхи MAPK беруть участь у проліферації та рухливості клітин, апоптозі, передачі інформації, отриманої від позаклітинних стимулів, з кінцевим результатом активації різних факторів транскрипції, які регулюють експресію генів [15].

Передача інформації в клітині починається зі сприйняття зовнішніх сигналів рецепторами, які розташовані на клітинній мембрані. Ці рецептори можуть бути простими (двокомпонентні системи), складними (рецептори тирозинкінази) або входити до складу великих білкових комплексів. Багато з цих рецепторів пов'язані з G-білками, які передають отриману інформацію всередину клітини.

У всіх видів грибів шляхи MAPK відіграють важливу роль у фізіологічних процесах, таких як клітинний цикл, реакція на стрес, вірулентність, морфогенез, стійкість до УФ-випромінювання та зміни температури, цілісність клітинної стінки, деградація клітинних органел, відповідь на молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням (DAMP).

У різних видів грибів, включаючи *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, описано існування сенсорних білків, таких як Sln1, Sho1, Msb2, Opy2, Snf1, що взаємодіють із зовнішніми сенсорами Wsc, Gpr1, Ypd1, Ssk1, Cdc42, Bem4 та активують відповідні шляхи MAPK [16,17].

1.2.2. Система інвазійності, вірулентності мікроміцетів

Вірулентність патогенних мікроорганізмів визначається їхньою здатністю подолати захисні механізми рослини і спричинити розвиток захворювання. Авірулентні мікроорганізми, навпаки, стимулюють у рослини ефективні захисні реакції, які блокують розвиток патологічного процесу.

Апопласт- це простір поза клітинними мембранами рослин, включає всі міжфібрилярні та міжміцелярні простори клітинної стінки, міжклітинні простори та ксилему, а також усі простори та матриці, що утворюються між плазматичною мембраною рослини та клітинною стінкою грибів під час інфікування. В апопласті присутні інші мікроорганізми, які конкурують за простір і поживні речовини, тому ця зона не є стерильним середовищем. Вони синтезують гідролітичні ферменти, антибіотики, токсини та летючі речовини, які можуть ще більше перешкоджати росту грибів.

Для успішної колонізації гриби мають доставити до клітин рослини-хазяїна набір факторів вірулентності- ефектори. До них належать ферментативні або неферментативні білки, вторинні метаболіти та малі РНК. Усі ефектори спочатку потрапляють в апопласт. Деякі з ефекторів виконують свою функцію вірулентності лише в ньому, а інші транспортуються з апопласта до цитоплазми рослинної клітини, де виконують свою функцію вірулентності.

Більшість охарактеризованих ефекторних білків грибів, асоційованих з рослинами, не є ферментами. Вони мають довжину менше 300 амінокислотних залишків та містять сигнальний пептид для секреції. Зазвичай складно передбачити, який з ефекторних білків функціонує в

апопласті. Для прогнозування часто використовують показник вмісту цистеїну, оскільки велика кількість даної амінокислоти, ймовірно, утворює внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки, необхідні для стабільності та функціонування у багатому на протеази апопласті. Окрім високого вмісту цистеїну, ефекторні білки мають високий вміст малих амінокислот, але низький вміст глютамінової кислоти, а також кислотних та заряджених амінокислот [18].

Ефекторні білки ниткоподібних грибів виконують різноманітні біологічні функції для сприяння колонізації хазяїна. Багато з них відіграють роль у порушенні регуляції імунітету рослини, що запускається гліканами. Апопласт багатий на хітинази та β -глюканази, які руйнують цілісність клітинної стінки мікробів та вивільняють хітин та β -глюканові олігомери, які потім можуть бути розпізнані рецепторами імунної системи на поверхні клітин для активації захисних механізмів рослини.

Доведено, що як симбіотичні, так і патогенні гриби використовують апопластичні ефекторні білки для регуляції імунітету, що запускається гліканами [19].

FovPDA - полісахаридна деацетилаза з грибкового патогену *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*, що вражає судини, безпосередньо деацетилює олігомери хітину до хітозану, що перешкоджає захисним реакціям.

PsXEG1 та PsXLP1 є апопластичними ефекторними білками з *Phytophthora sojae*, ооміцетового патогену стебла та кореневої гнилі сої.

PsXEG1 містить домен глікозидгідролази родини GH12 з активністю ксилоглюканази, яка є критичною для повної вірулентності патогену. Під час інфікування активність ксилоглюканази PsXEG1 пригнічується білком-інгібітором ендоглюканази, специфічним до ксилоглюкану сої, GmGIP1.

PsXLP1 подібний до PsXEG1 АЕБ з укороченим доменом GH12, позбавлений активності ксилоглюканази. Щоб запобігти цьому інгібуванню, *P. sojae* використовує PsXLP1 як приманку для захисту PsXEG1 від

інгібіторної дії GmGIP1. Цей захист досягається за рахунок зайняття ділянок зв'язування PsXEG1 на GmGIP1, дозволяючи PsXEG1 виконувати свою функцію вірулентності [20].

1.3. Взаємодія рослин і патогена

Ниткоподібні гриби можуть утворювати з рослинами різні типи взаємодії: від взаємовигідних (гриби-симбіонти) до патогенних (деякі гриби та ооміцети). Результат цих взаємодій, сумісність чи несумісність, часто визначається саме в апопласті.

Рослини синтезують протеази, вторинні метаболіти та гідролітичні ферменти щоб перешкоджати росту грибів та ооміцетів. В зоні апопласту містяться рецептори імунної системи, розташовані на поверхні клітин, які розпізнають сигнали вторгнення та активують захисні механізми рослини [21].

Розрізняють дві форми індукованої системної стійкості рослин: набута системна резистентність (systemic acquired resistance- SAR) та індукована системна резистентність (induced systemic resistance- ISR), які відрізняються між собою механізмом виникнення та шляхами регуляції. Зазвичай ISR та SAR залежать від сигнальних молекул жасмонової та саліцилової кислоти відповідно.

Індукована резистентність, незалежно від того, чи відбувається вона через SAR або ISR, передбачає активацію захисних механізмів рослин не тільки в місці індукції, але й в інших частинах рослини.

В результаті індукції резистентності в рослинах активуються різні структурні та біохімічні захисні механізми. До них належать:

- Синтез PR-білків та фітоалексинів- низькомолекулярних сполук з антимікробними властивостями.
- Синтез активних форм кисню, що пов'язано з сигнальними реакціями гіперчутливості.

- Біосинтез фенілпропаноїдів, які сприяють процесам посилення клітинної стінки, таким як лігніфікація, та відкладення каллози [22].
- Активація ферментів, пов'язаних із захистом рослин, зокрема пероксидази (POD), супероксиддисмутази (SOD), фенілаланінаміази (PAL), поліфенолоксидази (PPO), β -1,3-глюканази та хітинази [2322].

1.3.1. Набута системна резистентність (SAR)

SAR активується патогенними організмами і залежить від накопичення саліцилової кислоти (SA) та регуляторного білка NPR1, резистентність пов'язана з накопиченням PR-білків (pathogenesis-related), багато з яких мають протимікробну дію та вважаються маркерами активації SAR [24]. NPR1 є центральним регулятором обох шляхів захисту, оскільки після отримання сигналу він сприяє експресії генів, пов'язаних із захистом рослин, тим самим ініціюючи SAR або ISR. Зв'язування NPR1 із SA спричиняє зміну структури NPR1 з вивільненням С-кінцевого трансактиваційного домена. Це дає можливість NPR1 транспортуватися до ядра, брати участь у взаємодії із транскрипційними факторами, необхідними для зв'язування комплексу з промотором генів PR-протеїнів, і активувати їх експресію.

Вільні радикали гідроген пероксиду є причиною активації синтезу саліцилової кислоти і захисту рослин SA-шляхом. Збільшення концентрації SA підсилює реакції надчутливості (hypersensitive response- HR), оскільки саліцилат є інгібітором каталази, яка розщеплює H_2O_2 . Тобто H_2O_2 , активуючи синтез SA, сприяє ще більшому накопиченню активних форм кисню і тим самим підсилює HR [25].

Місцем синтезу SA є пластиди ушкоджених тканини, кислота не є мобільною молекулою. Мобільною сигнальною формою SA є метилсаліцилат (Me-SA), який транспортується до неушкоджених ділянок флоемою, забезпечуючи системний захист рослини загалом. У неуражених тканинах-мішенях Me-SA деметилується із утворенням SA. Також мобільною

сигнальною молекулою є піпекоева кислота. SA та її кон'югати є ключовими елементами для розвитку реакції надчутливості- швидкої локальної загибелі інфікованих рослинних клітин разом з патогеном.

Штучним шляхом SAR зазвичай запускається обробкою рослини абіотичними агентами, такими як ацибензолар-S-метил (ASM).

1.3.2. Індукована стійкість рослин (ISR)

Індукована системна резистентність (ISR) опосередкована ризобактеріями, непатогенними мікроорганізмами через їх компоненти клітинної стінки або метаболіти. ISR не залежить від саліцилової кислоти і не передбачає накопичення PR-білків. Її сигнальний шлях залежить від інших гормонів, таких як жасмонова кислота та етилен, а також від NPR1 як початкового сигнального білка.

Індукторами резистентності можуть бути ліпополіцукориди і сидерофори, компоненти джгутиків, біосурфактанти, N-ацил-гомосеринлактони (AHL), N-алкіловані бензиламіни, антибіотики та екзополіцукориди. Якщо у рослин не формується ISR, це зумовлено відсутністю синтезу індукторів ISR мікроорганізмами або нездатністю конкретного виду рослин сприймати ці сполуки як індуктори ISR.

Процеси вільнорадикального окиснення є першою лінією у системному захисті. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} активує переміщення ензиму фосфоліпази D із цитозолу до плазмолем, індукуючи в ній ензиматичну активність. Активна фосфоліпаза D необхідна для утворення жасмонової кислоти та її етеру- стресових гормонів, сигнальних молекул системного захисту рослини.

Жасмонова кислота (JA) та її метиловий етер метилжасмонат (Me-JA) зазвичай синтезуються у разі механічного ушкодження клітин із ліноленою та лінолевою кислот, які утворюються унаслідок гідролізу фосфоліпідів клітинних мембран. Таким чином місцем синтезу JA є ушкоджені тканини.

Жасмонова кислота транспортується флоемою до неушкоджених ділянок, а летка сполука Me-JA транспортується повітрям, що забезпечує системний захист рослини загалом. Системін-пептиду, який транспортується флоемою та до складу якого входить 18 амінокислот, стимулює синтез JA. Раніше системін вважали системним мобільним сигналом, що відповідає за індукцію захисних реакцій у віддалених від місця ураження тканинах. Але останні дослідження показують, що системін необхідний для продукування системного сигналу в місцях ураження, зокрема листків, але не для передавання його на відстань. Системін сприяє також експресії генів ліпоксигеназного сигнального шляху, що приводить до вивільнення ліноленової кислоти і її перетворення на JA.

Жасмонова кислота разом із іншими фітогормонами, зокрема з етиленом, активує експресію генів, які кодують антифунгальні білки: тіонін, осмотин, PDF (plant defensin gene) і білок RIP60 (replication invitation-region protein), які мають здатність інактивувати рибосоми патогена. Жасмонова кислота стимулює активність генів біосинтезу фітоалексинів та фенольних сполук [26].

1.3.3. Патоген-залежні білки в стійкості до грибів

Білки, пов'язані з патогенезом (pathogenesis-related (PR-) protein) є основними молекулами в системі захисту рослин, які індукуються у відповідь на інфікування фітопатогенами та стресові умови, включаючи порушення цитоплазми. PR-білки класифікують на 19 сімейств на основі подібності послідовностей, ферментативної активності та структури, включаючи β -1,3-глюканази, хітинази, пероксидази, білки, подібні до тауматину, рибосом-інактивуючі білки, неспецифічні білки переносу ліпідів, оксалат-оксидазу та білки, подібні до оксалат-оксидази [27]. PR-білки є мономерами досить низької молекулярної маси (8-50 кДа). Для них характерна стійкість до дуже кислого середовища (наприклад, в екстракційному буфері рН 2,8) та до протеїназ, що свідчить про низький обмін речовин.

PR-білки можуть бути індуковані етиленом, саліциловою кислотою та різними елісаторами. В лабораторних умовах деякі PR-білки індуються при обробці солями важких металів, фітогормонами, поліакриловою кислотою, похідними амінокислот, за умов осмотичного або сольового стресу, УФ-випромінюванням.

Молекули елісаторів природно містяться в клітинній стінці патогенів, а деякі PR-білки можуть гідролізувати полісахариди, перетворюючи ці полімери на олігосахариди. Таким чином, елісатори можуть індукувати три типи стійкості, включаючи місцеву набуту стійкість, набуту системну стійкість (SAR) та індуквану системну стійкість (ISR) [28]. Білки, яким не властива антимікробна активність, але експресія яких посилюється внаслідок інфікування патогенами, також іноді називаються PR-білками. PR-білки, які мають кислотні властивості, зазвичай накопичуються в клітинній стінці, а ті, які мають основні- у вакуолях.

PR-1 індукується патогенами або саліциловою кислотою і часто використовується як маркер SAR. Вони є білками низької молекулярної маси (15–17 кДа) і гомологічні суперсімейству багатих на цистеїн білків.

β -1,3-глюканази, що належать до родини PR-2, є ферментами, які каталізують гідроліз β -1,3-глюканових зв'язків у клітинних стінках грибів. Ці ферменти відіграють як пряму, так і непряму роль у захисті рослин від грибкових патогенів. Пряма роль полягає в деградації клітинної стінки гриба, що призводить до його загибелі. Непряма роль пов'язана з утворенням олігосахаридних елісаторів, які індують системну набуту резистентність у рослини [29].

Хітинази родини PR-3 гідролізують β -1,4-глікозидні зв'язки, що з'єднують залишки N-ацетилглюкозаміну хітину та відіграють пряму роль у захисті рослин, гідролізуючи хітин.

PR-5, до яких належать перматини, осмотини, зеаматини, об'єднує білки з високою гомологією до білка тауматину. Ці білки мають невелику

молекулярну масу і виконують захисну функцію, спричиняючи утворення пор в клітинних мембранах грибів. Це призводить до порушення осмотичного тиску і загибелі мікроміцета.

Пероксидази, що належать до PR-9, є гемовмісними оксидоредуктазами, які каталізують окиснення широкого ряду субстратів з використанням перекису водню як акцептора електронів. У відповідь на інфікування патогенами, активність пероксидаз зростає, що пов'язано з їх участю в окислювальних процесах модифікації фенольних сполук клітинної стінки. Ці процеси призводять до посилення структурної міцності клітинної стінки.

PR-10 залежно від своєї будови та функцій поділяються на дві основні групи: внутрішньоклітинні білки, пов'язані з патогенезом (IPR), з гомологією до рибонуклеаз та (S)-норкоклауринсинтаз (NCS) [30].

1.4. Взаємодія бактерій класу PGPR і рослин

Ґрунтові мікроорганізми як частина ґрунтової екосистеми відіграють важливу роль у регулюванні родючості ґрунту, кругообігу поживних речовин та підтримці видового різноманіття рослин [31]. Симбіоз рослин та ґрунтових мікроорганізмів дозволяє рослинам ефективніше засвоювати поживні речовини з ґрунту, успішно протистояти фітопатогенним мікроорганізмам і краще адаптуватися до несприятливих умов середовища. Вторинні метаболіти, низькомолекулярні (амінокислоти, органічні кислоти, цукри) та високомолекулярні (полісахариди, вітаміни) сполуки, що виділяються коренями, слугують хемоаттрактантами, які стимулюють міграцію мікроорганізмів до ризосфери.

PGPR (plant growth-promoting bacteria)- група корисних мікроорганізмів, до яких відносяться вільноживучі форми бактерій у ґрунті та ризобактерії, які колонізують ризосферу кореня.

PGPR можуть безпосередньо стимулювати ріст рослин, збільшувати врожайність та поживну цінність, сприяти стійкості до різних абіотичних та

біотичних стресів. До механізмів, за допомогою яких PGPR сприяють росту рослин, належать солюбілізація фосфору та калію в ґрунті, синтез сидерофорів для покращення доступу до заліза, фіксація атмосферного азоту, що обумовлено наявністю ферментного комплексу нітрогеназ. Також PGPR синтезують фітогормони, такі як ауксини, цитокініни та гібереліни, та антимікробні речовини, екзополісахариди, а також беруть участь в активації індукованої системної стійкості (ISR) [32].

Бактерії родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum* належать до найбільш відомих PGPR сої.

1.4.1. Система розпізнавання бактерій рослинами

В умовах обмеженого вмісту азоту корені бобових виділяють флавоноїди, що активує транскрипцію Nod factor (nodulation factors, NF)-сигнальних молекул ризобій. Nod factor структурно є ліпохітоолігосахаридами, що розпізнаються рослинними рецепторами, створеними з двох гістидинкіназ із позаклітинним доменом LysM.

Фактори Nod ініціюють встановлення симбіозу між бобовими та ризобіями шляхом індукції утворення бульбочок. Ризобії зв'язуються зі специфічними лектинами, присутніми в кореневих волосках сої, які разом із факторами Nod призводять до утворення вузликів [33]. Однією з найважливіших властивостей рослини є синтез леггемоглобіну, який підтримує низьку концентрацію кисню та запобігає пригніченню активності нітрогенази.

Бактерії також можуть встановлювати зв'язки через сигнальні молекули N-ацил-гомосерин-лактони (AHL), які також можуть служити для виявлення змін навколишнього середовища та щільності бактеріальної популяції.

1.4.2. Рістстимулюючі та антибіотичні сполуки

Вважається, що до 80% бактерій, виділених із ризосфери вищих рослин, мають здатність синтезувати ауксини. До таких PGPR належать роди

Acetobacter, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*. Серед ауксинів, що синтезуються бактеріями, найбільше значення має індол-3-оцтова кислота (ІОК). До морфологічних змін рослин, пов'язаних із синтезом ауксинів бактеріями PGPR, відносяться збільшення кількості корневих волосків і бічних коренів, скорочення довжини кореня. Збільшення площі кореневої системи може призвести до виділення більшої кількості корневих ексудатів, які діють як субстрат для розвитку мікробних спільнот у ризосфері [34, 35]. Ефект стимулювання росту рослин бактеріями, у якому задіяний ауксин, відомий як фітостимуляція.

Гібереліни- фітогормони, які стимулюють ріст рослин шляхом подовження стебла, беруть участь у проростанні насіння, цвітінні та зав'язуванні плодів, а також сприяють збільшенню швидкості фотосинтезу та підвищенню вмісту хлорофілу [36]. До PGPR, які можуть синтезувати гібереліни, належать *Bacillus spp.*, *Bradyrhizobium*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Rhizobium*, *Azotobacter spp.*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas spp.*, *Promicromonospora spp.* та *Streptomyces laurentii*.

Цитокініни впливають на диференціацію клітин у меристематичних тканинах, розвиток пагонів і коренів, ріст додаткових бруньок, біосинтез хлорофілу та транспорт поживних речовин, регулюють апікальне домінування. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* і *Bradyrhizobium japonicum* мають здатність синтезувати цитокініни шляхом експресії ізопентенілтрансферази- ферменту, що ініціює біосинтез фітогормону [37].

Етилен бере участь у регуляції реакції рослин на біотичні та абіотичні стреси, а також у формування кореневої системи, проростанні насіння, дозріванні плодів та опаданні листя. За умов стресу фермент дезаміназа 1-аміноциклопропан-1-карбонова кислоти (ACC дезаміназа) діє як один із

ключових ферментів, за допомогою яких RGPB можуть впливати на розвиток і ріст рослин.

Значну роль у стимуляції росту рослин відіграють леткі органічні сполуки. ЛОС регулюють синтез та метаболізм фітогормонів, що синтезуються рослинами або RGPB, а також перешкоджають розвитку деяких грибкових захворювань. Так 2,3-бутандіол стимулює ріст пагонів, а диметилгексадециламін, β -фенілетанол, гептакозан і октакозан чинять протигрибкову дію. Бактеріальні ЛОС зазвичай складаються з алкенів, спиртів, кетонів, терпенів, бензоноїдів, піразинів, кислот і складних ефірів [38].

Бактеріальні пептиди можуть пригнічувати фітопатогенні гриби родів *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Alternaria*, *Phytophthora* та *Botrytis*. Найважливішим є виробництво таких антибіотичних сполук, як сурфактин, азоміцин, фенгіцин, рамноліпіди, канозамін, феназин-1-карбонова кислота (ФКА), бутиролактони, аеругін, цепафунгіни, караліцин [39]. До ферментів, які відповідають за деградацію компонентів клітинних стінок фітопатогенних грибів, належать хітиназа, β -1,3-глюканаза, протеаза та ліпаза.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Місце проведення досліджень та обладнання лабораторії

Дослідження проводили в навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії на базі кафедри екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України. Використовували наступне обладнання: мікроцентрифуга-вортекс AG 22331, дистилятор GFL 2008, ваги RADWAG WPX-210/C/1 0,001, термостат електричний ТС 80М-2, центрифуга MiniSpin Eppendorf, ламінарний бокс YLGH 19, автоклав.

2.2. Приготування поживних середовищ

Для приготування картопляно-глюкозного агару до 1 л відвару картоплі (200 г картоплі на 1 л води) додали 15,0 г агару, помістили на вогняний штатив та нагрівали при постійному помішуванні до повного розчинення. Додали 15,0 г глюкози, після її розчинення довели об'єм розчину до 1 л. Довели рН до рівня 7,2-7,4. Розлили в чашки Петрі та стерилізували в автоклаві при тиску 1 атм протягом 15-20 хв при температурі 121° С. Зберігали чашки Петрі при температурі 2-8° С.

Для приготування картопляно-глюкозного бульйону до 1 л відвару картоплі (200 г картоплі на 1 л води) додали 15,0 г глюкози, помістили на вогняний штатив та нагрівали при постійному помішуванні до повного розчинення. Довели рН до рівня 7,2-7,4. Розлили в конічні колби та стерилізували в автоклаві при тиску 1 атм протягом 15 хв при температурі 121° С. Зберігали приготоване поживне середовище за температури не вище 25° С.

2.3. Виділення корневих екзометаболітів рослин *Glycine max L.*

Для дослідження вторинних метаболітів сої, серед яких значна кількість належить до класу флавоноїдів, рослини сої сорту Кіото

виросли в умовах польового дослідження за обробки мінеральними препаратами (табл. 2.1), схема досліджень:

- 1 варіант – контроль (без обробки);
- 2 варіант - Добродій Комфорт;
- 3 варіант - Добродій Комфорт + Добродій ОМД (Органо-мінеральне добриво);
- 4 варіант - Добродій Комфорт + Добродій ОМД+ Мікропротект.

Табл. 2.1

Склад мінерально-органічних препаратів «Добродій»

| Назва препарату | Складова характеристика до г/л |
|--|---|
| Добродій Комфорт | Іони сірки (S), селену (Se), міді (Cu), йоду (I), алюмінію (Al), ванадію (V), нікелю (Ni), кобальту (Co). |
| Добродій ОМД (Органо-мінеральне добриво) | (N) азот – Азотовмісні сполуки у перерахунку на азот – 330, (K) калій – уперерахунку на K ₂ O – 60, (B) бор – 0.36, (Mo) молібден – 0.013, (Fe) залізо – 1.44, (Mn) манган – 1.44, (S) сірка – 9.6, (Cu) мідь – 2.4, (Zn) цинк – 1.2, (Mg) магній – 33, (Co) кобальт – 0.037 Гумінові і фульвокислоти 30 г/кг Регулятори росту. Мікроелементи хелатовані карбоновими кислотами |
| Мікро протект | Препарат створено шляхом хелатування природними ді- і трикарбоновими органічними кислотами (зокрема бурштиною, винною та яблучною) активних елементів: міді (Cu) – 15, (Zn) цинк – 16, (Mn) манган – 7.2, (Mo) молібден – 2, (Co) кобальт – 1.5, (Fe) залізо – 8 |

Рослини сої сорту Кіото відбирали в польових умовах на стадії формування четвертого трійчастого листка. Обробку рослин *Pseudomonas putida* проводили шляхом оприскування по листу культуральною рідиною з живими клітинами бактерій в об'ємі 5,0 мл за наступною схемою:

1б варіант – обробка *P. putida*;

2б варіант - Добродій Комфорт + *P. putida*;

3б варіант - Добродій Комфорт + Добродій ОМД (Органо-мінеральне добриво) + *P. putida*;

4б варіант - Добродій Комфорт + Добродій ОМД+ Мікропротект + *P. putida*.

Рослини поміщали у стерильний посуд із додаванням стерильної дистильованої води та витримували впродовж 72 год на розсіяному світлі за температури 22-24 °С для виділення корневих екзометаболітів. Екsudати змивали з коренів, отриману водну фазу очищували картриджами для твердофазної екстракції з оберненофазовим сорбентом. Для цього картридж з С18 фазою врівноважували 5,0 мл метанолу, потім 5,0 мл 1% розчину мурашиної кислоти. Через картридж пропускали 100 мл водної фази. Кореневі екsudати елюювали 1,0 мл метанолу [Помилка! Джерело посилання не знайдено.]. Отримані екзометаболіти використовували для подальших досліджень.



Рис. 2.1. Виділення корневих екзометаболітів рослин *Glycine max* L.

Зразки листків сої збирали з рослин та екстрагували (1:10) 80% розчином метанолу. Екстракти зберігали у морозильній камері за температури -15-20° С.

2.4. Визначення антифунгальної дії метанольних екстрактів вторинних метаболітів рослин

Визначення антифунгальної активності виділених корневих ексудатів щодо *Fusarium oxysporum* проводили модифікованим експрес-методом лунок. Для дослідження використовували 3-денну культуру гриба. На поживне середовище вносили диск *Fusarium oxysporum*, діаметром 0,8 см. По периметру в 3 лунки вносили водно-спиртові екстракти корневих екзометаболітів. Динаміку росту колонії визначали на 2-6 добу культивування.

Морфометричні показники росту міцелію аналізували у спеціалізованій програмі Image Pro-Premier 10.0.15.

2.5. Визначення біохімічного складу корневих екзометаболітів та метанольних екстрактів листя *Glycine max* L.

Хроматографічне профілювання комплексу фенольних сполук у листках сої проводили методом високоефективної тонкошарової хроматографії на пластинах silica gel 60 (Merck, Німеччина) у системі розчинників: етилацетат-мурашина кислота-оцтова кислота-вода (v / v / v / v – 100: 11: 11: 25). На стартову лінію наносили зразки метанольних екстрактів листків сої об'ємом 5,0 мкл. Після просушування хроматограму обробляли розчином дифенілбариллоксіетиламіну та ПЕГ 400, нагрівали 30 с при температурі 100° С і досліджували в УФ (365 нм) [41].

Хроматографічне профілювання комплексу фенольних сполук корневих ексудатів сої проводили методом високоефективної тонкошарової хроматографії на силікагелі у системі розчинників: хлороформ- оцтова

кислота- метанол- вода (v / v / v / v - 60: 32: 12: 8). На стартову лінію наносили зразки метанольних екстрактів корневих ексудатів сої об'ємом 7,0 мкл. Після просушування хроматограму обробляли розчином анісового альгеду, нагрівали 5 хв при температурі 100° С і досліджували в УФ (365 нм).

Фотоденситометричний аналіз хроматограми проводили за допомогою спеціалізованої програми Sorbfil TLC View version 2.3. Статистичну обробку даних проводили за допомогою платформи MetaboAnalyst 6.0.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Вплив вторинних метаболітів листків та корневих екзотметаболітів сої на ростові характеристики міцелію ізоляту *F. oxysporum*

У процесі спостереження за ростом міцелію на поживних середовищах була виявлена тенденція до нерівномірного радіального росту культури мікроміцета *F. oxysporum*. Це визначалося утворенням концентричних зон з різною яскравістю кольору міцелію. Мікроскопічний аналіз підтвердив, що в зонах з більш яскравим забарвленням щільність гіф на одиницю площі та їх розгалуженість була значно більша за зони з менш яскравим забарвленням. Останні характеризувалися малорозгалуженими гіфами з більшим діаметром, що може свідчити про активний лінійний ріст культури мікроміцета.

У варіанті, де в лунки вносили екзотметаболіти коренів контрольних рослин та тих, що були оброблені культуральною рідиною *P. putida*, виявлено дві зони підвищеної щільності міцелію на початку росту і в кінці (рис. 3.1, вар. 1).

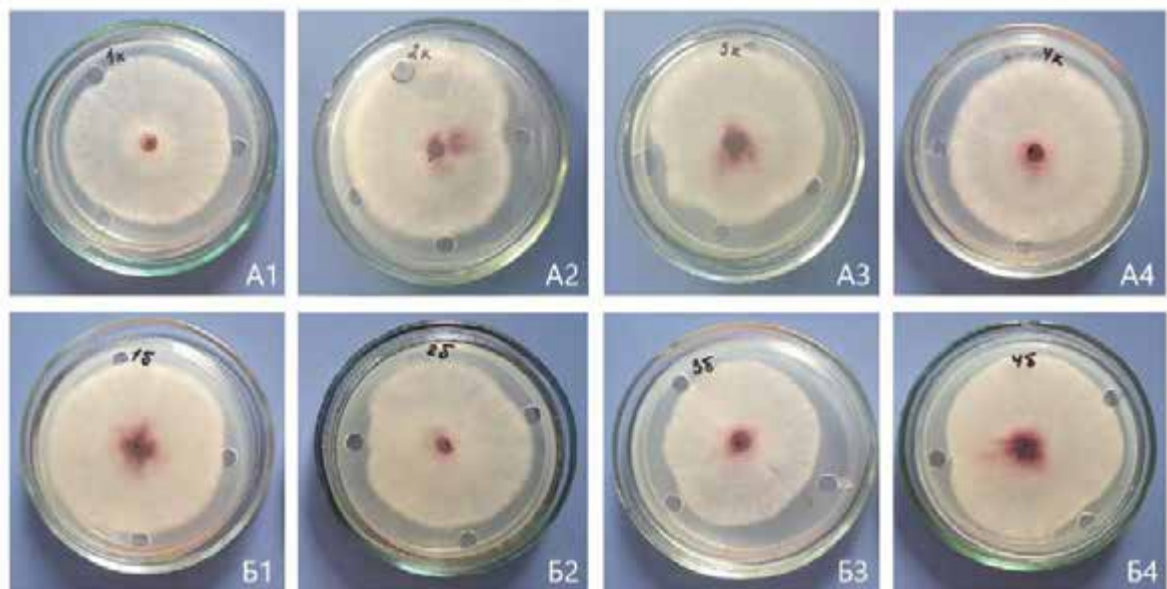


Рис. 3.1. Антифунгальна дія водно-спиртових екстрактів корневих екзотметаболітів сої на радіальний приріст міцелію *F. oxysporum*: А1 контроль, А2-А4 рослини після обробки мінерально-органічними комплексами, Б1 після обробки культуральною рідиною з живими клітинами *P. putida*, Б2-Б4 рослини за обробки

мінерально-органічними комплексами та за додаткової обробки культуральною рідиною з живими клітинами *P. putida*

Найбільш активно щільність міцелію збільшувалася після внесення в лунки корневих екзометаболітів (рис. 3.2). Це може бути обумовлено наявністю серед екзометаболітів сої речовин, які є тригерами активації росту фітопатогенного гриба. За умов обробки рослин мінерально-органічними комплексами ефект нерівномірного росту міцелію був краще виражений у варіанті 2 (Добродій Комфорт) та варіанті 3 (Добродій Комфорт + Добродій ОМД). Після обробки рослин культуральною рідиною з живими клітинами *P. putida* спостерігалось зменшення щільності (рис. 3.2, вар. 4) та пригнічення росту міцелію *F. oxysporum*.

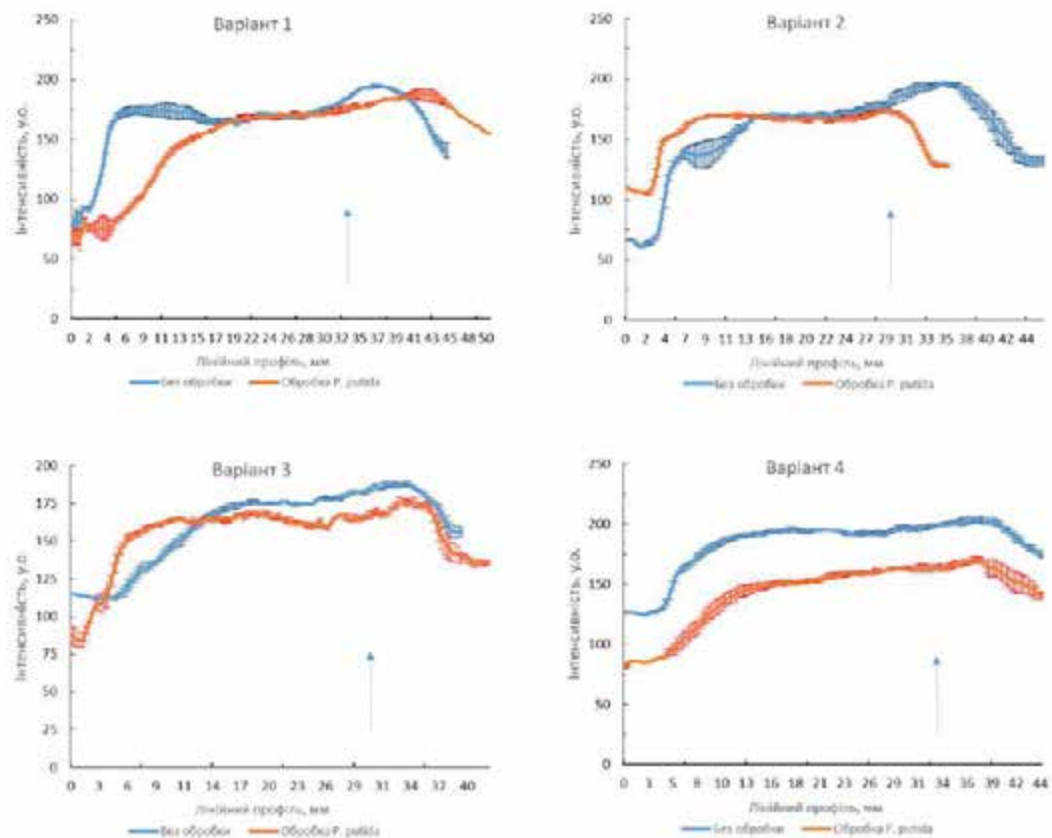


Рис. 3.2. Особливості впливу екзометаболітів коренів сої на морфологію та радіальний приріст культури *F. oxysporum* (за оптичними показниками)

За умов внесення в лунки ендометаболітів листків сої (рис. 3.3) до культури гриба в цілому спостерігали специфіку його радіального росту, які описані вище для екзометаболітів коренів. Близькі за характером ростових процесів мікроміцети відзначено у варіанті 2 (Добродій Комфорт) та варіанті 3 (Добродій Комфорт + Добродій ОМД). В контрольних зразках пригнічення росту міцелію і зниження його щільності спостерігалось у варіанті обробки рослин культурою *P. putida*.

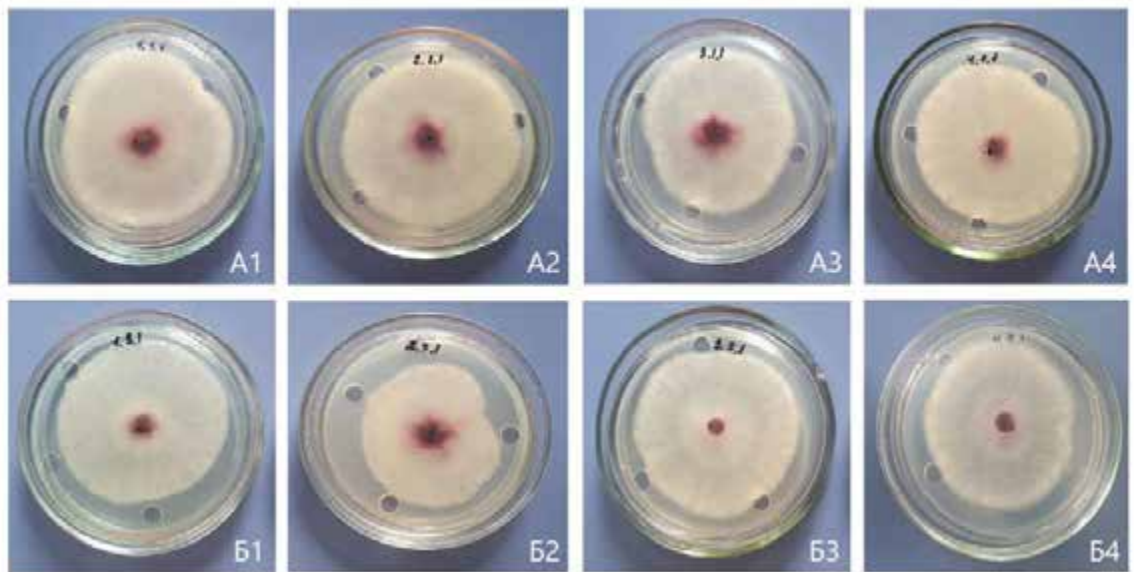


Рис. 3.3. Антифунгальна дія водно-спиртових екстрактів ендометаболітів листків сої на радіальний приріст міцелію *F. oxysporum*: А1 контроль, А2-А4 рослини після обробки мінерально-органічними комплексами, Б1 після обробки культуральною рідиною з живими клітинами *P. putida*, Б2-Б4 рослини за обробки мінерально-органічними комплексами та за додаткової обробки культуральною рідиною з живими клітинами *P. putida*

У 2 варіанті екзо- і ендометаболіти сої мали виражену антифунгальну дію (рис. 3.4). Враховуючи, що в обох варіантах дослідження значний антифунгальний ефект виявили саме ті рослини, які були оброблені мікроелементним комплексом, який містив наноаквахелати сірки, селену, міді, йоду, алюмінію, ванадію, нікелю та кобальту з наступним розпиленням на поверхню надземної частини рослин культури *P. putida*, можна

припустити, що доступні для бактеріальних клітин мікроелементи сприяли активації синтезу сполук з антибіотичною дією.

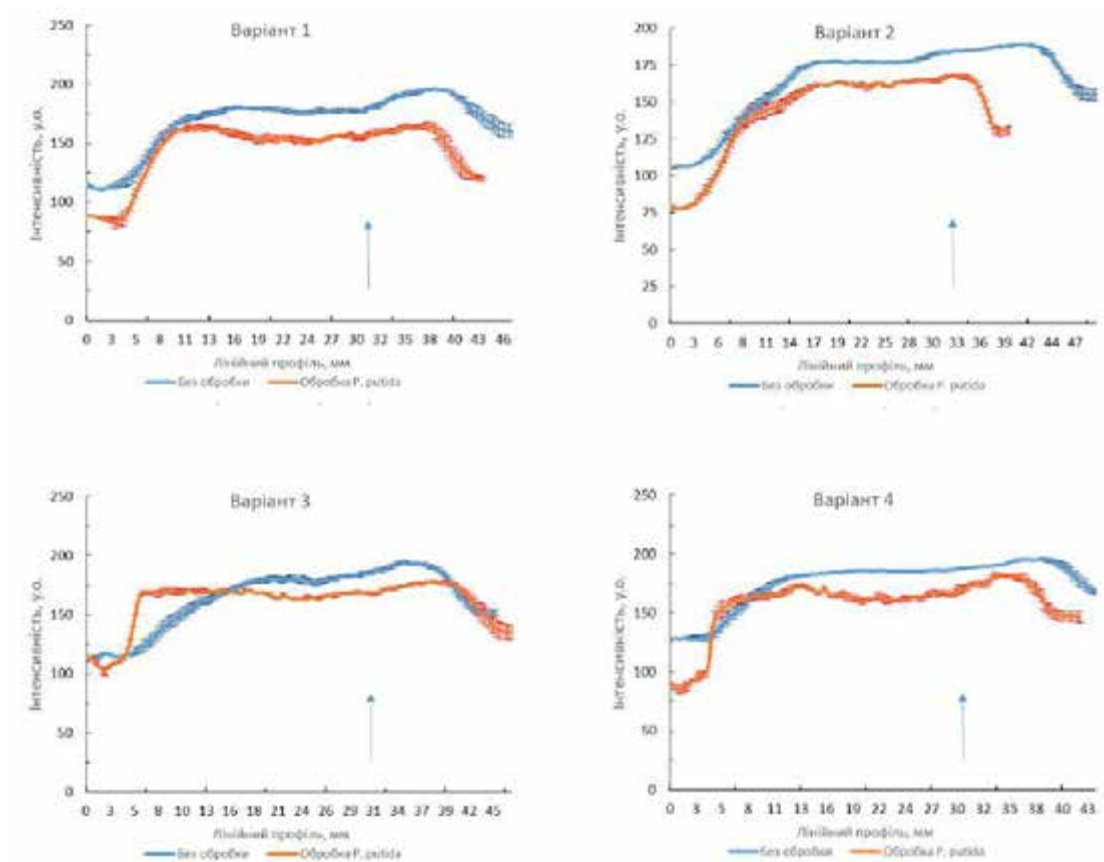


Рис. 3.4. Особливості впливу ендометаболітів листків сої на морфологію та радіальний приріст культури *F. oxysporum* (за оптичними показниками)

Вплив мінерально-органічних добрив (варіанти 2к, 3к і 4к), порівняно з контролем, виявив різницю у впливі способів обробки на синтез в тканинах рослин речовин з фунгіостатичною дією, що було підтверджено через їхній безпосередній вплив на ріст міцелію.

Отже, різні комплекси мінерально-органічних добрив по-різному впливають на біохімічний склад корневих екзометаболітів, які в процесі виділення можуть розпізнаватися ризобіальними бактеріями та прямо або опосередковано впливати на ріст міцелію фітопатогенних мікроміцетів.

Вплив бактерій *Pseudomonas putida* виявився за умов додавання живих клітин, що в переважній більшості випадків призводило до незначного зменшення площі міцелію порівняно з відповідними варіантами за відсутністю цього штаму бактерій (наприклад, 2к vs 2б, 3к vs 3б).

Цікавим є те, що на 3 добу найменша площа міцелію біла визначена у варіантах 2б і 3б (табл. 2.2)- різниця площі міцелію з контрольним варіантом (1к) становила 18,1 % та 17,0 % відповідно. Це свідчить про те, що обробка рослин бактеріями *Pseudomonas putida* у комплексі з мінерально-органічними добривами, представленими у варіантах 2 і 3, посилює антифунгальну дію екстрактів по відношенню до *Fusarium*.

На четверту добу найбільш ефективним у данному аспекті був варіант 2б- площа міцелію була менше на 16,5 % у порівнянні з контрольним варіантом. Отже, мінерально-органічні добрива здатні впливати на рослинний організм таким чином, що продукти його метаболізму пригнічують ріст *Fusarium*. Цей ефект, можливо, пов'язаний з середньополярними продуктами вторинного синтезу, або їх хелатованими з металами формами, оскільки в експерименті використовували водно-спиртові екстракти кореневих екзометаболітів. Втім, характер цього впливу залежить від конкретного способу обробки рослин добривами. Бактерії *Pseudomonas putida* посилюють пригнічення росту *Fusarium*, але цей ефект не є стабільним і може залежати від впливу інших чинників.

Табл. 2.2.

Середній діаметр (мм) міцелію *F. oxysporum* в залежності від дії кореневих екзометаболітів сої за умов різної обробки рослин

| Варіант | Контроль | | Добродій Комфорт | | Добродій Комфорт + ОМД | | Добродій Комфорт + ОМД + Мікропротект | |
|---------|----------|------|------------------|------|------------------------|------|---------------------------------------|------|
| | 1к | 1б | 2к | 2б | 3к | 3б | 4к | 4б |
| 3 доба | 42,9 | 40,7 | 37,1 | 35,1 | 39,1 | 35,6 | 41,4 | 40,5 |
| 4 доба | 73,5 | 69,4 | 66,9 | 61,3 | 65,4 | 62,0 | 74,9 | 70,6 |

Спільна дія мінерального комплексу гумінових та фульвокислот дещо знижувала ефект пригнічення росту міцелію водно-спиртовими екстрактами. Однак, додаткова обробка по поверхні листя культурою органо-мінеральним комплексом посилила атифунгальну дію екзометаболітів коренів.

Виявлений ефект може свідчити про фізіологічний стрес, в якому можуть перебувати рослини в результаті обробки надлишковими за складом та кількістю елементами, що містяться в органо-мінеральному комплексі. Відновлення антифунгальної активності у випадку обробки рослин *Pseudomonas putida* ми пов'язуємо зі здатністю бактерій засвоювати вільні і необхідні їм елементи і включати в свій метаболізм, що активує синтез специфічних молекул з біоцидною активністю.

3.2. Біохімічний склад листків сої *Glycine max L.*

Хроматографічний аналіз екстрактів листків сої показав доволі високу стабільність фенольних профілів, які нараховували до 18 індивідуальних сполук (рис. 3.5). Переважна більшість речовин визначена за яскравою флуоресценцією під дією УФ (355 нм), що характерно для гідроксикоричних і гідроксибензойних кислот та їх кон'югатів.

Після обробки хроматографічної пластини натуральним реагентом (NP-реагент) додатково було виявлено 4 флавоноїда, які за характерною яскравою флуоресценцією можна віднести до класу флавонолів. Консервативними для переважної більшості зразків сої були флавоноїди з коефіцієнтом утримання $R_f \sim 0,38$ і $0,99$. Уміст флавоноїда з $R_f \sim 0,49$ вирізнявся дещо більшою варіативністю за кількісними показниками в залежності від способу обробки рослин, а флавонол із $R_f \sim 0,64$ переважно накопичувався у листках сої після обробки препаратом Добродій Комфорт або за його сумісним використанням разом із препаратом Добродій ОМД.

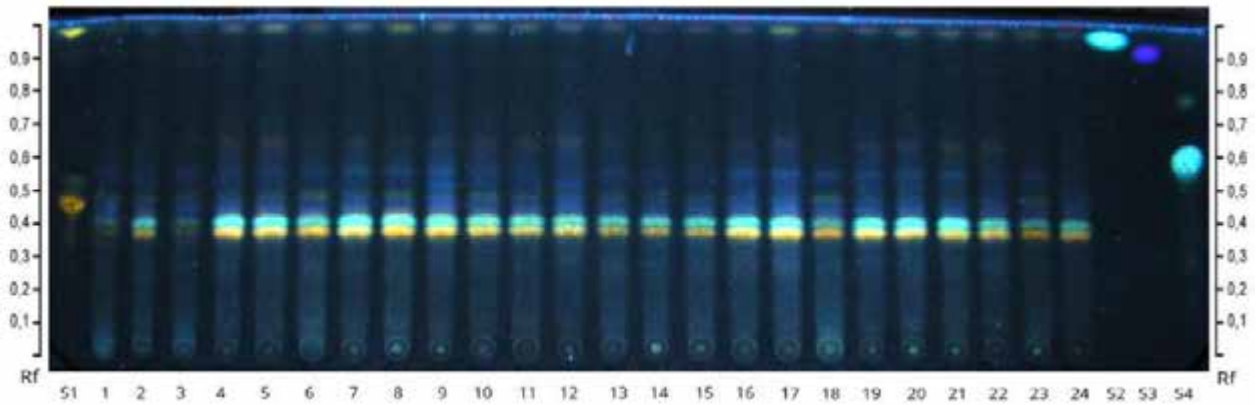


Рис. 3.5 Хроматографія водно-спиртових екстрактів листків *Glycine max L.*: 1-3 рослини без обробки, 4-6 обробка препаратом Добродій Комфорт, 7-9 обробка Добродій Комфорт + Добродій ОМД, 10-12 Добродій Комфорт + Добродій ОМД + Мікро протект, 13-15 обробка *P. putida*, 16-18 Добродій Комфорт + *P. putida*, 19-21 Добродій Комфорт + Добродій ОМД + *P. putida*, 22-24 Добродій Комфорт + Добродій ОМД + Мікро протект + *P. putida*; стандарти: S₁- рутин, кварцетин, S₂- ферулова кислота, S₃- галова кислота, S₄- хлорогенова кислота

Варто зауважити, що обробка рослин культуральною рідиною з живими клітинами *Pseudomonas putida* супроводжувалась зниженням концентрації флавоноїдів ($R_f \sim 0,49$ і $0,64$) у листках (рис. 3.7). Отже можна припустити, що ці поліфеноли пов'язані з дією бактерій або продуктів їх виділення на рослинний організм. Зниженням синтезу флавоноїдів і виділення їх через корені в ґрунт може впливати на мікробіом ґрунту, видовий склад мікроорганізмів та формування рослинно-мікробних взаємодій.

Для перевірки надійності дискримінантної моделі проводили крос-валідацію (рис. 3.6) з визначенням показників загальної точності моделі, класифікації відповідних зразків, використанням коефіцієнту детермінації R^2 , який вказує на частину варіації даних, які пояснюються моделлю, а також даних Q^2 , за якими проводиться оцінка передбачуваності моделі.

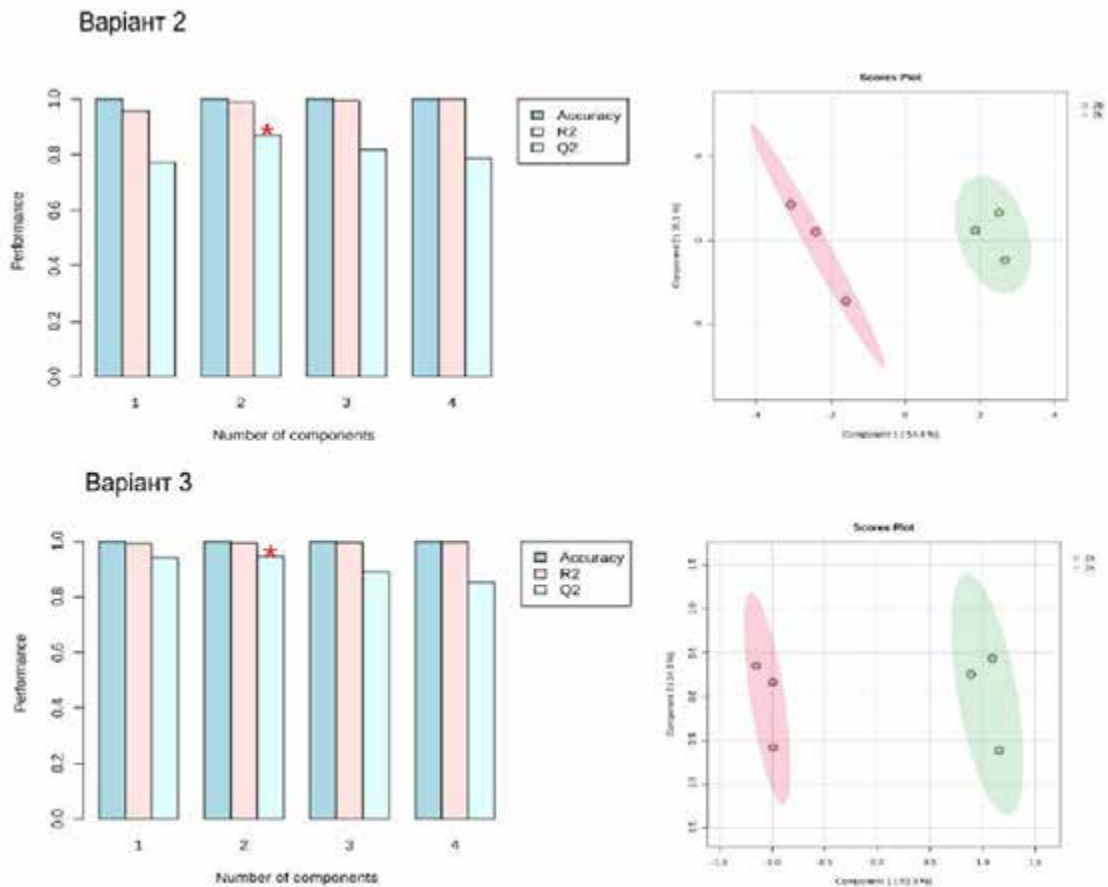


Рис. 3.6. Результати дискримінантного аналізу метаболічних профілів водно-спиртових екстрактів листків *Glycine max L.*: графік розподілу зразків за компонентами 1 і 2, гістограма крос валідації моделі дискримінантного аналізу; рослини, що оброблені препаратами «Добродій Комфорт» (2к), «Добродій Комфорт + Добродій ОМД» (3к) і за додаткової обробки культуральною рідиною з живими клітинами *Pseudomonas putida* (2b, 3b)

Крос валідація показала, що для перших 3 компонентів високі значення точності (Ассурасу) достатньо надійно класифікують досліджені зразки. Високі значення R^2 вказують на відповідність моделі використаним даним, а високі значення Q^2 свідчать про надійність моделі в прогнозуванні відмінностей між зразками у групах.

На графіку Scores Plot групи рослин за метаболічними профілями чітко розділяються між собою, а еліпси, які окреслюють довірчі інтервали, свідчать про те, що проаналізовані зразки доволі тісно згруповані всередині кожної

групи. Компоненти 1 та 2 описують 89,5% загальної дисперсії. Перша компонента (54,4%) пояснює більшу частину варіації даних. Вони включають основні відмінності між групами рослин за способом обробки. Друга компонента (35,1%) переважно висвітлює розсіювання даних у межах кожної окремої з груп. За отриманими результатами різні способи обробки рослин (препарат «Добродій Комфорт», а також за додатковим внесенням бактерій *Pseudomonas putida*) викликають у вторинному метаболізмі сої значні зміни, про що свідчать фітохімічні профілі.

Близький результат було отримано для рослин за умов комплексної обробки рослин препаратами «Добродій Комфорт» + «Добродій ОМД» та з додатковим внесенням бактерій *Pseudomonas putida* (рис.). Компоненти 1 та 2 у дискримінантній моделі за такого способу обробки рослин описують 77,4% загальної дисперсії. Перша компонента (63,3%) дозволяє виділяти рослини за способом їхнього обробки в окремі групи. Отже, рослини змінюють метаболізм під впливом живих клітин *Pseudomonas putida*.

Для більш детального розуміння механізмів, що лежать в основі відповідних змін і виявлення потенційних біомаркерів було виконано ортогонально-дискримінантний аналіз фітохімічних профілів (рис. 3.7).

Ортогонально-дискримінантний аналізу дозволяє поєднати оцінку рівнів відмінності окремих продуктів метаболізму із їх достовірністю. Гістограма за показниками p_1 , o_1 пояснюють найбільшу частину варіації даних. Вони створюють новий простір, де зразки різних груп розташовуються так, щоб максимально відрізнитися один від одного. Коефіцієнт детермінації (R^2X) для незалежних змінних показує, яка частина дисперсії окремих метаболітів пояснюється створеною моделлю. Коефіцієнт детермінації для залежної змінної (R^2Y) визначає частину дисперсії окремих групи зразків, яка пояснюється створеною моделлю. Оцінка передбачуваної здатності моделі (Q^2) дозволяє оцінити наскільки точно ОДА модель екстраполюється на нові дані.

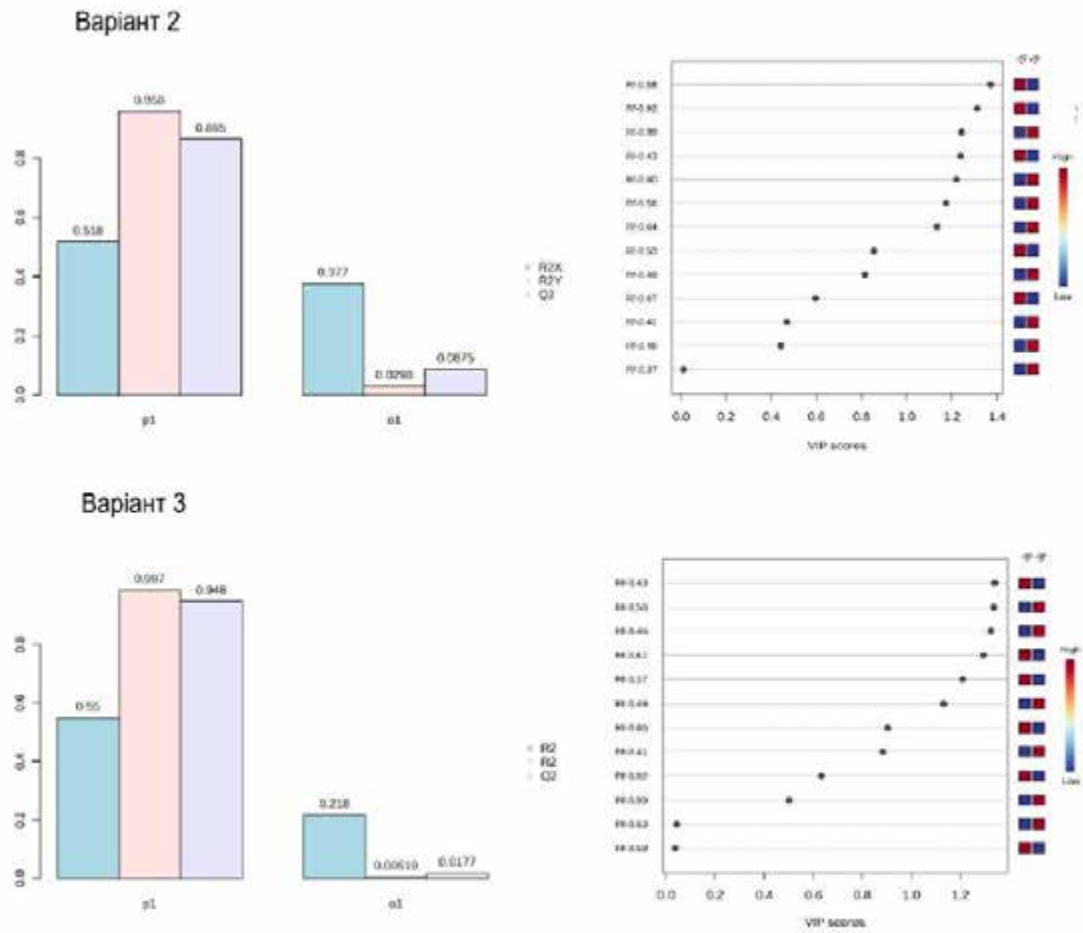


Рис. 3.7. Результати ортогонально-дискримінантного аналізу метаболічних профілів водно-спиртових екстрактів листків *Glycine max L.*:

графік розподілу зразків за компонентами 1 і 2, гістограма крос-валідації моделі дискримінантного аналізу; рослини, що оброблені препаратами «Добродій Комфорт» (2к), «Добродій Комфорт + Добродій ОМД» (3к) і за додаткової обробки культуральною рідиною з живими клітинами *Pseudomonas putida* (2b, 3b)

На графіку VIP score (*Variable Importance in Projection*) положення продуктів метаболізму за відповідною шкалою залежить від їх внеску в міжгрупову відмінність за дії стимулів. Чим вище VIP score значення індивідуального продукту метаболізму, тим більшим є його внесок у дискримінацію досліджуваних груп. Результати проведеного нами аналізу свідчать про те, що рослини сої надзвичайно чутливі до обробки мінерально-

органічними комплексами, особливо у поєднанні з ендofітними мікроорганізмами.

Отримана модель дозволила також виділити потенційні біохімічні маркери, за якими досліджені групи рослин відрізнялися між собою. Серед найінформативніших виділено речовини з $R_f \sim 0.43$ та $R_f \sim 0.67$. На графіку порівняльно високий вміст цих сполук позначений маркерами червоного кольору (рис. 3.7). Бактерії *P. putida* стимулювали ці ланки метаболізму. Водночас вони уповільнюють нагромадження у листках речовин з $R_f \sim 0.56$, $R_f \sim 0.46$. Ці метаболіти в подальшому можуть бути використані для дослідження лабільних ланок метаболізму *Glycine max* L., відповідальних за синтез активних речовин, які потенційно виконують важливу роль у взаємодії рослин і ендofітними бактеріями.

3.3. Біохімічний склад корневих екзометаболітів сої

Хроматографічне профілювання екзометаболітів коренів сої дозволило виявити 7 фенольних сполук (табл. 3.1), які були визначені за яскравою флуоресценцією під УФ світлом (355 нм).

Табл. 3.1

Результати фотоденситометричного аналізу хроматографічного розділення екзометаболітів коренів *Glycine max* L.

| Пик | Rf | Контроль | | Добродій Комфорт | | Добродій Комфорт + ОМД | |
|-----|------|----------|-------|------------------|-------|------------------------|--------|
| | | 1к | 1б | 2к | 2б | 3к | 3б |
| 1 | 0,45 | 16291 | 46488 | 13307 | 27414 | | |
| 2 | 0,48 | 7096 | 10618 | 9855 | 12475 | 21822 | 17423 |
| 3 | 0,52 | 7927 | 12488 | 8166 | 10927 | 17192 | 19223 |
| 4 | 0,59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23127 | 39483 |
| 5 | 0,72 | 10350 | 11378 | 8675 | 10612 | 0 | 0 |
| 6 | 0,75 | 11423 | 10320 | 10341 | 11331 | 27080 | 87366 |
| 7 | 0,85 | 0 | 0 | 9129 | 10719 | 27978 | 18423 |
| | Сума | 53087 | 91292 | 59473 | 83478 | 117199 | 181918 |

Також після обробки натуральним реагентом за характерною жовто-зеленою флуоресценцією було виявлено 1 флавоноїд. Враховуючі, що саме екстракти кореневих виділень показали найбільшу фунгістатичну дію по відношенню до фітопатогену, варто визначити який з цих метаболітів може розглядатись у якості потенційних біомаркерів.

Наскільки чутливим є вторинний синтез рослин на обробку препаратів, що містять мінеральні речовини і кислоти вказують результати фотоденситометричного і дискримінантного аналізів, які підтверджують значимість впливу досліджуваних чинників на метаболізм *Glycine max L.* (рис. 3.8).

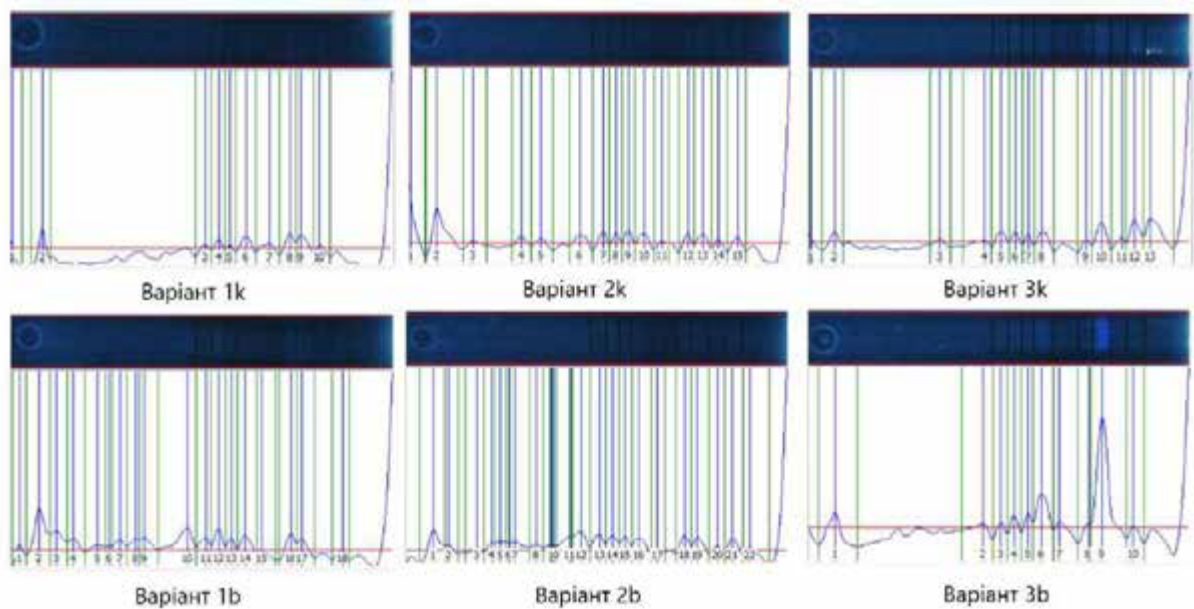


Рис. 3.8. Результати фотоденситометричного аналізу водно-спиртових екстрактів кореневих екзометаболітів *Glycine max L.* за відповідними треками на хроматограмі: 1k – контроль, 2k - Добродій Комфорт, 3k - Добродій Комфорт + Добродій ОМД, 1b – *P. putida*, 2b – Добродій Комфорт + *P. putida*, 3b - Добродій Комфорт + Добродій ОМД + *P. putida*

На Plot-графіку дискримінантного аналізу (рис. 3.9) груп рослин за метаболічними профілями чітко розділяються між собою, а еліпси, які окреслюють довірчі інтервали, свідчать про те, що проаналізовані зразки

доволі тісно згруповані всередині кожної групи. Компоненти 1 та 2 описують 89,5% загальної дисперсії. Перша компонента (54,4%) пояснює більшу частину варіації даних. Вони включають основні відмінності між групами рослин за способом обробки. Друга компонента (35.1%) переважно висвітлює розсіювання даних у межах кожної окремої з груп. За отриманими результатами різні способи обробки рослин (препарат «Добродій Комфорт», а також за додатковим внесенням бактерій *Pseudomonas putida*) викликають у вторинному метаболізмі сої значні зміни, про що свідчать фітохімічні профілі.

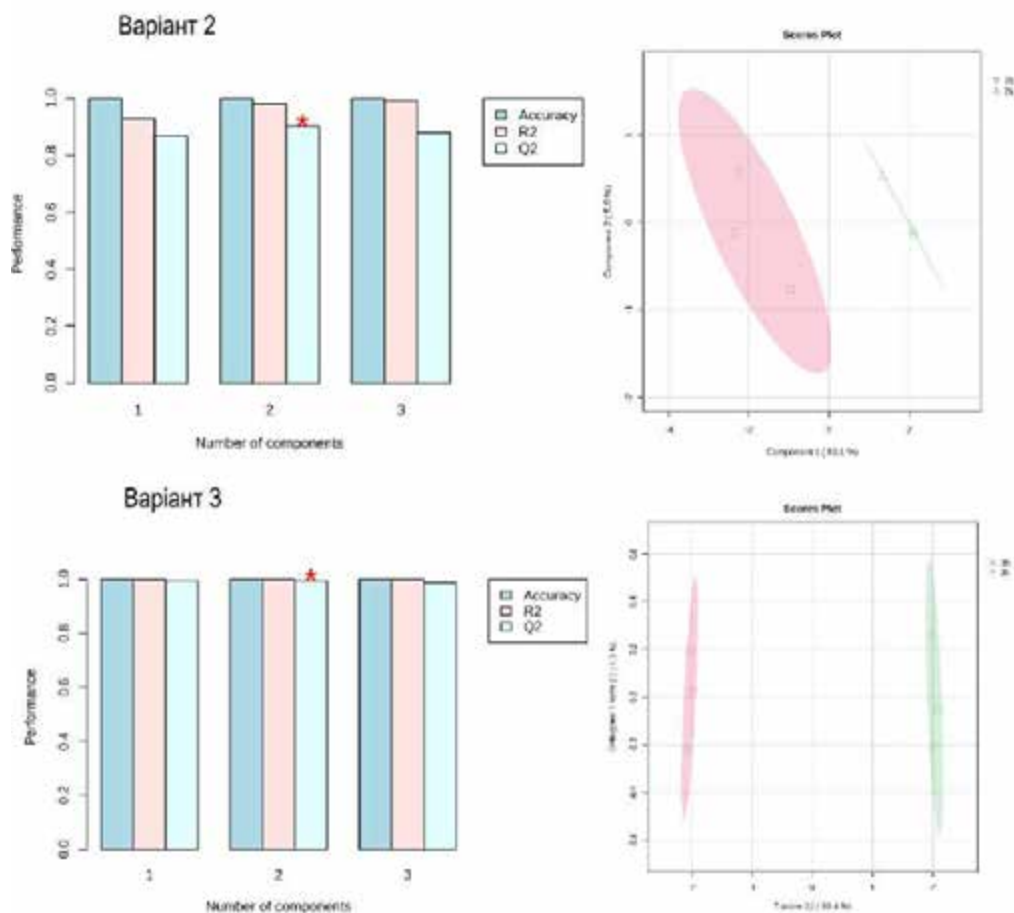


Рис. 3.9. Результати дискримінантного аналізу метаболічних профілів екзометаболітів коренів *Glycine max L.*: графік розподілу зразків за компонентами 1 і 2, гістограма крос валідації моделі дискримінантного аналізу; рослини, що оброблені препаратами «Добродій Комфорт» (2к), «Добродій Комфорт + Добродій ОМД» (3к) і за додаткової обробки культуральною рідиною з живими клітинами *Pseudomonas putida* (2b, 3b)

Отримані результати свідчать про те, що комбінована обробка рослин мінерально-органічним препаратом та бактеріями *Pseudomonas putida* призводить до суттєвих змін у метаболічному профілі корневих екзометаболітів. Це відкриває перспективи для розробки нових біотехнологічних підходів до підвищення стійкості рослин та поліпшення якості ґрунту.

Оброблені мінерально-органічним препаратом (група 3k) рослини виділяли коренями меншу кількість сполук з потенційно антифунгальними властивостями порівняно з рослинами (група 3b), які додатково обробляли культуральною рідиною з живими бактеріями *Pseudomonas putida* по поверхні листків сої.

Як було описано вище, в ортогонально-дискримінантному аналізі у разі суттєвої різниці показників незалежних змінних ($R^2X = 0,841$ проти $0,106$), залежних змінних ($R^2Y = 0,928$ проти $0,0534$ і оцінки передбачуваної здатності моделі ($Q^2 = 0,912$ проти $0,0241$) у осях p_1 та o_1 досліджувані групи рослин (2k і 2b, 3k і 3b) значно розділяються в просторі компонентів ОДА за якісним і кількісним складом корневих екзометаболітів (рис. 3.10).

Варто також зазначити, що в залежності від способу обробки рослин вагомий внесок у різницю між групами розподілявся між різними метаболітами. Єдиним достовірно значимим біомаркером для рослин незалежно від способу обробки препаратами була речовина з $R_f \sim 0.48$. Водночас для рослин, що оброблялись мінеральним препаратом «Добродій Комфорт» найінформативнішими були середньополярні сполуки з $R_f \sim 0.45$ і 0.52 . Для рослин, що обробляли комплексом препаратів («Добродій Комфорт + Добродій ОМД») кандидатами були менш полярні сполуки з $R_f \sim 0.75$ і 0.85 . Така різниця може свідчити про чутливість і лабільність реакцій рослин, їх залежність від зовнішніх стимулів, хімічного складу препаратів. Виділені на графіку VIP scores метаболіти, ймовірно, відіграють ключову

роль у цих змінах, але тільки один з них ($R_f \sim 0.48$) визначено як потенційних маркер чутливості рослин сої.

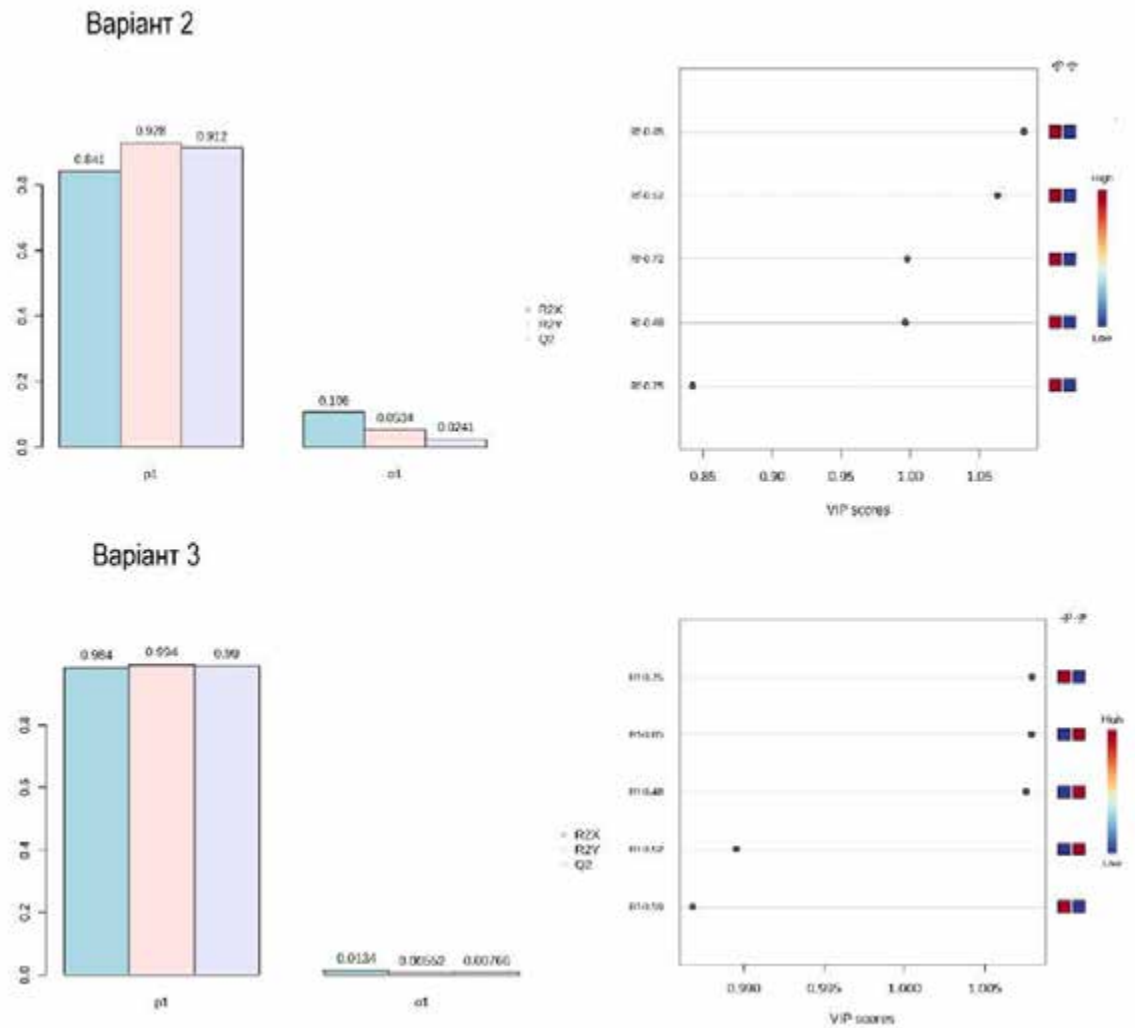


Рис. 3.10. Результати ортогонально-дискримінантного аналізу метаболічних профілів екзометаболітів коренів *Glycine max* L.: графік розподілу зразків за компонентами 1 і 2, гістограма крос валідації моделі; дві групи: 3а (Добродій Комфорт + ОМД) та 3б (Добродій Комфорт + ОМД + *P. putida*).

В цілому, отримані результати підтверджують важливість ендofітних та ризобіальних мікроорганізмів, як додаткового бар'єру з рухомим кордоном між рослиною та зовнішнім середовищем. Це середовище включає як природні макро-, мікроелементи, кислоти, і ті компоненти, дії яких рослини піддаються під час обробки в агрофітоценозах.

Бактерії, ймовірно, здатні збільшувати вміст доступних для них і рослин мікроелементів. У разі їх нестачі бактерії використовують природні резерви (у вигляді тимчасово недоступних іонів). Однак, вони також можуть знижувати стресове навантаження у разі їх надмірного вмісту доступних хімічних елементів у ґрунті або навколишньому природному середовищі, яке виникає внаслідок природних геологічних процесів або технологічної трансформації.

У цьому аспекті перспективним є використання гранично низьких концентрацій органо-мінеральних комплексів спільно з бактеріями класу PGPR. Додавання бактерій *Pseudomonas putida* до обробки мінеральним препаратом призвело до значних змін у метаболічному профілі корневих екзометаболітів.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у рослин *Glycine max* L. сорту Кіото після обробки мінерально-органічними комплексами, які містять мікроелементи, галогени та іони металів (S, Se, Cu, I, Al, V, Ni, Co, N, K, B, Mo, Mn, Zn, Fe, Mg), гумінові й фульвокислоти, відбуваються зміни у вторинному метаболізмі, які впливають на їхню стійкість проти фітопатогенних грибів.
2. У біохімічних профілях листкових ендометаболітів рослин *Glycine max* L. виявлено 18 речовин, а біохімічні профілі корневих екзометаболітів представлені 7 сполуками класу фенолів.
3. Встановлена висока чутливість *Glycine max* L. сорту Кіото до дії *Pseudomonas putida*, які відносяться до класу рістстимулюючих ендоефітних бактерій і мають здатність активно засвоювати мікроелементи і включати їх у власний метаболізм, що активізує синтез специфічних молекул з біоцидною активністю.
4. Екстракти корневих ексудатів показали найбільшу фунгістатичну дію по відношенню до фітопатогенного мікроміцету *Fusarium oxysporum*, що свідчить про наявність в них біологічно активних низькомолекулярних сполук.
5. Комбінована обробка рослин мінерально-органічними комплексом у складі біопрепаратів та живими бактеріями *P. putida* впливає на метаболічні профілі корневих екзометаболітів. Корені рослин після обробки виключно мінерально-органічними препаратами виділяли у воду меншу кількість сполук з потенційно антифунгальними властивостями порівняно з рослинами, які додатково обробляли культуральною рідиною живих клітин *P. putida*.
6. Ортогонально-дискримінантний аналіз якісних змін у складі продуктів фенольного синтезу рослин сої, які відбувались під впливом органо-мінеральних препаратів (Добродій Комфорт і ОМД) та бактерій *P.*

Putida, дозволив виявити потенційні біомаркери чутливості рослин на компоненти препаратів. Серед листових ендометаболітів найбільш інформативними були низькомолекулярні сполуки з коефіцієнтами утримання $R_f \sim 0.43$ та $R_f \sim 0.67$. Серед корневих екзометаболітів сої в якості потенційного біомаркера стійкості рослин визначено флавоноїд з коефіцієнтом утримання $R_f \sim 0.48$;

7. З урахуванням результатів оцінювання ефективності застосування мікроелементних добрив досить перспективним для підвищення врожайності і стійкості виглядає їхнє застосування на рівні гранично низьких концентрацій у комбінації з бактеріями класу PGPR.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Massalha H, Korenblum E, Tholl D, Aharoni A. Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *Plant J.* 2017; 90 (4):788–807.
2. Sugiyama A, Yazaki K. Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. *Plant Biotechnol.* 2014; 31 (5):431–43.
3. Tawaraya K, Horie R, Shinano T, Wagatsuma T, Saito K, Oikawa A. Metabolite profiling of soybean root exudates under phosphorus deficiency. *Soil Sci Plant Nutr.* 2014;60(5):679–94.
4. Canarini A, Merchant A, Dijkstra FA. Drought effects on *Helianthus annuus* and *Glycine max* metabolites: from phloem to root exudates. *Rhizosphere* 2016; 2:85–97
5. Pichersky E, Lewinsohn E. Convergent evolution in plant specialized metabolism. In: Merchant SS, Briggs WR, Ort D, editors. Annual review of plant biology, vol. 62. Palo Alto: *Annual Reviews*; 2011;549–66.
6. Tzi BN, Ye XJ, Wong JH, Fang EF, Chan YS, Pan WL, et al. Glyceollin, a soybean phytoalexin with medicinal properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90 (1):59–68.
7. Weston LA, Mathesius U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of chemical ecology* 2013; 39(2):283–97.
8. Sugiyama A, Yamazaki Y, Hamamoto S, Takase H, Yazaki K. Synthesis and secretion of isoflavones by field-grown soybean. *Plant Cell Physiol.* 2017;58 (9):1594–600.
9. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014 ;49(6):439–62.

10. Singh B, Singh JP, Singh N, Kaur A. Saponins in pulses and their health promoting activities: a review. *Food Chem* 2017; 233:540–9.
11. Tsuno Y., Fujimatsu T., Endo K., Sugiyama A., Yazaki K. Soyasaponins: a new class of root exudates in soybean (*Glycine max*). *Plant and Cell Physiology*, 2018; 59.2: 366-375.
12. Van Loon L. C., Rep, M. and Pieterse, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2006, 44.1: 135-162.
13. Choi H.W., Klessig D.F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol*, 2016; 16, 232.
14. Zipfel C., Felix G. Plant and animal: a different taste for microbes. *Curr. Opin. Plant Biol*, 2005; 8, 353 – 360.
15. Dohlman H.G. Thematic minireview series: complexities of cellular signaling revealed by simple model organisms. *J Biol Chem*. 2016; 291:7786-7
16. Gu Q, Chen Y, Liu Y, Zhang C, Ma Z. The transmembrane protein FgSho1 regulates fungal development and pathogenicity via the MAPK module Ste50-Ste11-Ste7 in *Fusarium graminearum*. *New Phytol*. 2015; 206:315-28.
17. Gu Q, Zhang C, Liu X, Ma Z. A transcription factor FgSte12 is required for pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Pathol*. 2015;16:1-13.
18. Sperschneider J, Dodds PN, Singh KB, Taylor JM: Apoplast P: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytol* 2018, 217:1764-1778
19. Zeng T, Rodriguez-Moreno L, Mansurkhodzaev A, Wang P, van den Berg W, Gascioli V, Cottaz S, Fort S, Thomma BPHJ, Bono J-J et al.: A LysM effector subverts chitin-triggered immunity to facilitate arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 2019, 225

20. Ma Z, Zhu L, Song T, Wang Y, Zhang Q, Xia Y, Qiu M, Lin Y, Li H, Kong L et al.: A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a host inhibitor. *Science* 2017, 355:710-714 <http://dx.doi.org/10.1126/science.aai7919>
21. Van der Burgh AM, Joosten MHAJ: Plant immunity: thinking outside and inside the box. *Trends Plant Sci* 2019, 24:587-601
22. Kesel J. D, Conrath U, Flors V, Luna E, Mageroy MH, Mauch-Mani B, Pastor V, Pozo MJ, Pieterse CMJ, Ton J, et al. The induced resistance lexicon: do's and Don'ts. *Trends Plant Sci* 2021, 26(7):685–691.
23. Jinal HN, Sakthivel K, Amaresan N. Characterisation of antagonistic *Bacillus paralicheniformis* (strain EAL) by LC–MS, antimicrobial peptide genes, and ISR determinants. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020, 113(8):1167–1177.
24. Panpatte DG, Jhala YK, Vyas RV. Signaling pathway of induced systemic resistance. Sharma V, Salwan R, Tawfeeq Al-Ani LK, editors. *Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture*. 1st. Cambridge: Elsevier; 2020, p. 133–141
25. Palmer, I. A., Shang, Z., Fu, Zh. Q. Salicylic acid-mediated plant defense: Recent developments, missing links, and future outlook. *Front. Biol.* 2017, 12, 4, 258– 270.
26. Панюта О. О., Шаблій В. А., Белава В. Н. Жасмонова кислота та її участь у захисних реакціях рослинного організму. *Укр. біохім. журн.*, 2009, т. 81, № 2, 14–26.
27. Zribi, I.; Ghorbel, M.; Brini, F. Pathogenesis Related Proteins (PRs): From Cellular Mechanisms to Plant Defense. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2021, 22, 396–412.
28. Finkina, E.I.; Melnikova, D.N.; Bogdanov, I.V.; Ovchinnikova, T.V. Plant pathogenesis-related proteins PR-10 and PR-14 as components of innate

- immunity system and ubiquitous allergens. *Curr. Med. Chem.* 2017, 24, 1772–1787.
29. Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B. Linear β -1, 3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* 2000, 124:1027–1037
30. Liu J, Ekramoddoullah AKM. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2006, 68:3–13
31. Fitzsimons, M. S., & Miller, R. M. The importance of soil microorganisms for maintaining diverse plant communities in tallgrass prairie. *American Journal of Botany.* 2010, 97: 1937-1943.
32. Gouda S., Kerry R.G., Das G., Paramithiotis S., Shin H.S., Patra J.K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research.* 2018. 206. P. 131-140.
33. Oldroyd, G.E.D. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11, 252–263.
34. Morales-Cedeño, L.R.; Orozco-Mosqueda, M.d.C.; Loeza-Lara, P.D.; Parra-Cota, F.I.; de los Santos-Villalobos, S.; Santoyo, G. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes as Biocontrol Agents of Pre- and Post-Harvest Diseases: Fundamentals, Methods of Application and Future Perspectives. *Microbiol. Res.* 2021, 242, 126612.
35. Duca, D.; Lorv, J.; Patten, C.L.; Rose, D.; Glick, B.R. Indole-3-Acetic Acid in Plant–Microbe Interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014, 106, 85–125.
36. Zaidi, A.; Ahmad, E.; Khan, M.S.; Saif, S.; Rizvi, A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Sustainable Production of Vegetables: Current Perspective. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 2015, 193, 231–239.

37. Wei, X.; Moreno-Hagelsieb, G.; Glick, B.R.; Doxey, A.C. Comparative Analysis of Adenylate Isopentenyl Transferase Genes in Plant Growth-Promoting Bacteria and Plant Pathogenic Bacteria. *Heliyon* 2023, 9.3.
38. Sharifi, R.; Ryu, C.-M. Revisiting Bacterial Volatile-Mediated Plant Growth Promotion: Lessons from the Past and Objectives for the Future. *Ann. Bot.* 2018, 122, 349–358.
39. Goswami, D.; Thakker, J.N.; Dhandhukia, P.C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric.* 2016, 2, 1127500.
40. Хархота, М. А., Рибальченко, Н. П., Грабова, Г. Ю., Авдєєва, Л. В. Методи дослідження метаболітів бактерій родини *Bacillaceae*. Київ: Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного. ТОВ ЦП «КОМПРИНТ», 2021. 170 с.
41. Мельничук, М. Д., Ліханов, А. Ф., Коваленко, Т. М., Ключаденко, А. А. Вторинні метаболіти та їх роль у системах адаптації і захисту рослин. *Вінниця: ВНАУ. Видавець ТОВ «Друк»* 2022. 71 с.

ДОДАТОК А

| | |
|---|-----|
| <i>Kosovska N.A., Matsenko Y.S., Borodal V.V.</i> | 104 |
| RATE OF RADIAL GROWTH OF <i>FUSARIUM SOLANI</i> MYCELIUM UNDER THE INFLUENCE OF ROOT EXOMETALOBITES OF SOY PLANTS | |
| <i>Koval R.V., Skratska O.I.</i> | 106 |
| INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES | |
| <i>Kozlova S., Likhanov A., Boroday V.</i> | 107 |
| CYCLIC LIPOPEPTIDES OF BACTERIA OF THE GENUS <i>BACILLUS</i> FOR PROTECTION AGAINST AGRICULTURAL CROP DISEASES | |
| <i>Krupodorova T., Kizitska T., Barshteyn V.</i> | 109 |
| COMPETITION BETWEEN SELECTED MACROMYCETES AND HARMFUL MICROORGANISMS | |
| <i>Krutylko D.V.</i> | 112 |
| COMPATIBLE USE OF TWO <i>BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM</i> STRAINS FOR SOYBEAN INOCULATION | |
| <i>Kulbanska I.M.</i> | 115 |
| BACTERIAL WETWOOD OF <i>ULMUS GLABRA</i> HUDS. IN THE RELICT CENOPOPULATION OF THE POKUTSKY CARPATHIANS | |
| <i>Kurdish I.K.</i> | 116 |
| PROSPECTS FOR THE USE OF THE COMPLEX BACTERIAL PREPARATION AZOGRAN IN ORGANIC FARMING | |
| <i>Kyrychenko A.M., Shcherbatenko I.S.</i> | 117 |
| THE D1S3L3 STEM-LOOP AS A POTENTIAL MOLECULAR TARGET FOR EFFECTIVE PROPHYLACTIC AND THERAPEUTICS OF PLANT VIRAL DISEASES | |
| <i>Kyrylav S.K., Tymoshenko A.D., Bida I.O., Havryliuk O.A., Hovorukha V.M., Tashyrev O.B.</i> | 119 |
| ANAEROBIC DEGRADATION OF <i>ARTEMISIA ABSINTHIUM</i> TO PRODUCE BIOMETHANE AND DETOXIFY TOXIC COPPER COMPOUNDS | |
| <i>Latina N.O.</i> | 120 |
| ASSESSMENT OF MICROBIAL CONTAMINATION OF MEDICAL WORKERS' SMARTPHONES | |
| <i>Latina N.O.</i> | 123 |
| MICROBIOLOGICAL MONITORING IN PUREUMATIC-INFLAMMATORY INFECTIONS OF WOUNDS IN WOUNDED AS A RESULT OF COMBAT ACTIONS | |
| <i>Lazarets P.</i> | 125 |
| STUDY OF THE BIOTECHNOLOGICAL PATHWAY OF SYNTHESIS OF RIBOFLAVIN AND ROSE ESSENTIAL OIL BY <i>EREMOTHECIUM ASHBYI</i> | |
| <i>Leonova N.O., Fomenko S.V.</i> | 128 |
| STIMULATING PHYTOHORMONAL COMPOUNDS OF NON-DIAZOTROPHIC ENDOPHYTIC SOYBEAN BACTERIA | |
| <i>Levishko A., Gumeniuk I.</i> | 130 |
| CHANGES IN SOIL MICROBIOCENOSIS AFTER THE IMPACT OF ACTIVE WARFARE IN UKRAINE | |
| <i>Lishchuk A. M., Parfenyk A. I., Karachinska N.V.</i> | 132 |
| ENVIRONMENTAL RISKS FOR THE DEVELOPMENT AND SPREAD OF PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS IN SOYBEAN AGROCENOSSES | |
| <i>Loboda M.I., Biliavska L.O.</i> | 134 |
| PLANT IMMUNITY PROMOTION VIA SALICYLIC AND JASMONIC ACIDS BIOSYNTHESIS INDUCTION BY <i>STREPTOMYCETES</i>' METABOLITES | |
| <i>Lusta M.V., Vorankova O.S.</i> | 136 |
| MONITORING OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> STRAINS AMONG THE ADULT POPULATION OF THE DNIPROPETROVSK REGION | |
| <i>Lypey I., Dmytrenko Y., Borsch K., Meleshko T., Boyko N.</i> | 138 |
| "QUICK HEALING" - AN INNOVATIVE APPROACH TO THE MENTAL RECOVERY AND REHABILITATION OF UKRAINIANS | |

RATE OF RADIAL GROWTH OF *FUSARIUM SOLANI* MYCELIUM UNDER THE INFLUENCE OF ROOT EXOMETALOBITES OF SOY PLANTS

KOSOVKA N.A., MATSENKO Y.S., BORODAI V.V.

Institute of Agroecology and Nature Management of the NAAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
kosovska.na@gmail.com

Plant exometabolites are characterized by high activity against phytopathogenic microorganisms and pests. They are easily decomposed in the environment [3]. The composition of exometabolites includes phenols, flavonoids, glycosides of flavonoids, alkaloids, which determine the competitive interaction between plants and mechanisms of protection of plants from pathogenic microorganisms and pests. In addition, allelopathic substances contain low-molecular compounds, such as sugars, vitamins, nucleotides and amino acids, as well as high-molecular substances - polysaccharides, enzymes and other proteins [4]. However, the mechanisms of influence of root exometabolites of soybean plants, grown using the technologies of biological preparations, on the growth and development of fungus *Fusarium solani* have not been sufficiently studied. This is due to the complexity of allelopathic interactions and methodological limitations regarding the study of signaling chemicals found in exometabolites [5].

The influence of exometabolites of seedlings of soybean varieties (Suzirya and Vyshivanka) on the rate of radial growth of the mycelium of *F. solani*, the causative agent of fusarium wilt of soybeans, was studied. Plant exometabolites were obtained according to the method of G.F.

Naumov [6], which was modified for the studied culture. 50 seeds of each studied variety were selected, sterilized and germinated in accordance with DSTU 4138 [7]. From each variety, 10 seedlings were selected, placed in containers with sterile distilled water and kept for 72 hours in diffused light at a temperature of 26–28°C. Exudates were washed and filtered through microporous bacterial filters (0.02 µm). Isolates of *F. solani* were cultivated on Capek's medium with placed discs to which 75 µl of plant exudates were added. Two options were used as a control: control 1 (K1) — sterile distilled water; control 2 (K2) — exometabolites of seedlings of soybeans grown according to traditional technology.

The rate of radial growth of fungal mycelium was determined by the formula:

$$Kr = (r_1 - r_0) \div (t_1 - t_0),$$

where Kr is the radial growth rate of colonies; r_0 is the radius of colonies at time t_0 ; r_1 is the radius of colonies at time t_1 [8].

Research results. It was established that the rate of radial growth of the fungal mycelium on both the sixth and the eleventh day of subcultivation with root exometabolites of soybean plants grown in the conditions of the control variant (K1) was on average 0.026 mm/h. On the sixth day of subcultivation with root exometabolites of Suzirya soybean plants grown using traditional technology (K2 standard — traditional technology), a significantly lower rate of radial mycelial growth was observed, which was 0.025 mm/h, i.e., 0.001 mm/h lower, than in the K1 variant. At the same time, against the background of exometabolites of the Vyshyvanka soybean variety in the specified variant, the rate of radial growth of the fungal colonies was 0.026 mm/h, which corresponds to the control (K1). It is worth noting that *F. solani* was characterized by the lowest value of radial mycelial growth rate when subcultivated with root metabolites of Suzirya soybean plants grown with the addition of biological preparation Mycohelp (0.022 mm/h), which is 1.18 times lower compared to the control (K1) and 1.14 times lower compared to the standard (K2). It was shown that the rate of radial growth of the mycelium of *F. solani* on the eleventh day of subcultivation with root exometabolites of soybean plants of Suzirya and Vyshivanka varieties, grown under the influence of biological preparations Fitotsid and Fitohelp, was equal to 0.023 mm/h, which is 1.13 times lower, compared with control options. This shows that at the initial stages of subcultivation, the antifungal property of root exometabolites of the tested soybean varieties depends significantly on both the variety itself and the technology of its cultivation.

The lowest rate of radial growth of the mycelium of *F. solani* was recorded during the eleventh day of subcultivation with exometabolites of Soybean plants of the Suzirya variety, grown under the influence of biological preparations Fitotsid (0.024 mm/h) and Mycohelp (0.024 mm/h), compared to variant K1 (0.026 mm /hour). However, it is necessary to note that the above options had values at the level of the standard (K2) (0.024 mm/h). The rate of radial growth of the mycelium of the studied fungus against the background of root exometabolites of soybean seedlings of the Vyshivanka variety, grown under the influence of biological preparations Fitotsid (0.024 mm/h) and Fitohelp (0.024 mm/h), was 0.002 mm/h lower than in the K1 option and 0.001 mm/h lower than in option K2, respectively.

Therefore, it can be assumed that the root exometabolites of plants of Suzirya and Vyshivanka soybean varieties, grown under the influence of biological preparations, possess antifungal properties, namely, the ability to restrain the growth and development of the mycelium of *F. solani*, compared to the root exometabolites of plants grown according to traditional technology.

Conclusions. The root exometabolites of soybean plants of the Suzirya variety, grown in the presence of biological preparations, are characterized by a higher antifungal ability compared to the root exometabolites of soybean plants of the Vyshivanka variety. Varietal specificity of root metabolites is an important element of plant resistance to soil pathogens. The technology of plants growing significantly affects the growth and development of plants, the formation of their resistance to pathogens, which is subsequently reflected on such physiological sign as the growth rate of mycelium of the phytopathogen *F. solani*. The root exometabolites of soybean plants grown under the influence of biological preparations can inhibit the growth and development of the fungal mycelium to a greater extent, which indicates their higher antifungal property compared to

the exometabolites of soybean plants grown according to conventional technology. In turn, restraining the development of soil pathogens will contribute to the regulation of the phytopathogenic background in soybean agrocenoses, reducing the intensity of their diseases.

References

1. Moshir R. A., Monira Y., Isma H. Incidence of seed borne mycoflora and their effect germination of maize seeds. *International Journal of Agricultural Research*. 2016. Vol. 8. No 1. P. 87-92.
2. Mauricio S. O., Alexandre R., Michael S., Rudolf K. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region. *Journal of Brazil Food Control*. 2017. Vol. 73. P. 127-132.
3. Yunosheva O.P., Ellanska N.E. Specificity of microbial communities of introduced plants *Lavandula angustifolia* Mill. *Pedology*. 2015. Vol. 16. No 1–2. P. 66–74.
4. Iqbal A. M. Plant sare the possible source of allelochemicals that can be useful in promoting sustainable agriculture. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2019. Vol. 28. No 2A. P. 1040–1049.
5. Novoplansky A. What plant roots know?. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2019. Vol. 92. P. 126-133. URL: <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.03.009>_(date of application: 18.10.2023).
6. Naumov G. F. Allelopathic properties of isolated germinating seeds of field crops and their agricultural significance. *Allelopathy and productivity of plants*. 1988. P. 5–12.
7. Agricultural crop seeds: Quality determination methods: DSTU 4138:2002. — [Effective from 2004-01-01]. Derzhstandard of Ukraine, 2002. 141 p. (National Standard of Ukraine).
8. Beznosko I. V. The effect of metabolites of sweet pepper varieties on the intensity of sporulation of the micromycete *Alternaria solani* (Ell. et Mart.). *Agroecological journal*. 2013. No. 2. P.106-109.

| | |
|---|-----|
| Фітопаразитичні нематоди трьох енергетичних культур для виробництва біопалива. <i>Луцюк А. С., Стефановська Т. Р.</i> | 230 |
| Особливості стерилізації вихідного матеріалу <i>Salvia officinalis</i> для введення в культуру in vitro. <i>Майданович Н.Р., Лобова О.В.</i> | 232 |
| Особливості методів стерилізації тюльпану для введення в умови in vitro. <i>Матвієнко А.О., Лобова О.В.</i> | 235 |
| Особливості дії біологічних препаратів при вирощуванні <i>Glycine max</i> L. <i>Маценко Я. С., Бородай В. В.</i> | 237 |
| Морфогенез та розмноження in vitro <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. <i>Моргул С.С., Кляченко О.Л.</i> | 239 |
| Застосування регуляторів росту стиму та регоплант у вирощуванні рослин міскантусу. <i>Остапенко К.В., Медков А.І., Бородай В.В., Стефановська Т.Р.</i> | 241 |
| Постасептична адаптація рослин регенерантів in vitro туї західної. <i>Павленко Ю.С., Коломіць Ю.В.</i> | 242 |
| Біологічно активні компоненти та мінеральні солі як ключові фактори в рості та використанні грибів <i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm. <i>Пигичко Р.О., Бойко О.А.</i> | 244 |
| Підбір живильногосередовища для одержання каллосу непентесу чудового (<i>Nepenthes mirabilis</i>) в умовах in vitro. <i>Пула В.С., Коломіць Ю.В.</i> | 246 |
| Стратегії застосування культивування <i>Daucus carota</i> in vitro для підвищення біорезистентності та виробництва корисних біопродуктів. <i>Самоліук А. А., Коломіць Ю. В.</i> | 248 |
| Вплив вуглецевих наноматеріалів на фізіологічні показники та структуру коренів сільськогосподарських рослин. <i>Северін С.М., Ткаченко Т.А.</i> | 250 |
| Мікроклональне розмноження зміголовника молдавського (<i>Dracocephalum moldavica</i> L.). <i>Сипченко О. Ю., Лобова О. В.</i> | 252 |
| Вплив біологічних активних речовин грибів роду <i>Daedaleopsis j.Schröt.</i> на ріст і розвиток овочевих культур. <i>Сірик А.С., Бойко О. А.</i> | 254 |
| Ефективність комплексного застосування біопрепаратів в технології вирощування сої. <i>Словіський В.В., Бородай В.В.</i> | 255 |
| Оцінка препарату на основі с6-hsl (п-гексаноїл-гомосеринлактон) для адаптації живців картоплі in vitro. <i>Царуліца О., Лісовий М.М.</i> | 257 |
| Введення <i>Pulsatilla alba</i> в культуру in vitro. <i>Швець В. В., Лобова О.В.</i> | 259 |
| Ксилотрофні базидієві гриби та їх використання в моніторингу екосистем. <i>Швець Д.О., Бойко О.А.</i> | 261 |
| Оптимізація біотехнології виробництва вакцини для птахівництва. <i>Шевченко А.В., Бородай В.В.</i> | 262 |
| Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів в різних матрицях. <i>Шкарбан П.О., Таран О.П.</i> | 264 |
| Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур <i>Шмигаль П.А., Бойко О.А.</i> | 266 |
| Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур. <i>Шмигаль П.А., Бойко О.А.</i> | 267 |

УДК 631.86/.87:633.34

ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ БІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ВИРОЩУВАННІ *GLYCINE MAX* L.

Маценко Я. С., магістр 1-го року, **Косовська Н. А.**, аспірантка
Науковий керівник: **Бородай В. В.**, д.с.-г.н.

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Інститут агроекології та природокористування НААН
e-mail: matsenkoyana20@gmail.com

Актуальність вирощування сої (*Glycine max* (L.) Merr.) в світі зумовлена її високою продуктивністю, широким спектром застосування та високим попитом на ринку. Соя використовується не тільки в харчовій промисловості, але і в виробництві біодизелю, кормів для тварин, а також як сировина для виробництва багатьох промислових продуктів. Це робить її однією з найбільш перспективних культур для вирощування. Для оптимізації процесу вирощування сої необхідно впровадження сучасних технологій.

Інокуляція насіння сої зазвичай сприяє збільшенню розмірів симбіотичного апарату, підвищує її врожайність, продуктивність, вміст сирого білка та жирів, мікроорганізми під час вирощування сої перетворюють складні сполуки у прості та доступні для живлення рослини. Завдяки повноцінному комплексу мікроорганізмів рослина сої отримує необхідне кореневе живлення, що реалізує генетичний потенціал її врожайності [1].

Обробка насіння сої біорегуляторами сприяє додатковому залученню у кругообіг атмосферного азоту, що є запорукою підвищення врожайності завдяки поліпшенню живлення рослин та регуляції кількості патогенних мікроорганізмів. Застосування біопрепаратів також позитивно впливає на підвищення біологічної ефективності рослинництва, зниженню вмісту нітратів, іонів важких металів і радіонуклідів.

Встановлено, що під впливом біопрепаратів активізуються фізіологічні процеси розвитку рослин сої, відбувається збільшення площі її листкової поверхні. Так, за обробки сої комплексом біопрепаратів ПП «БТУ-центр» площа листкової поверхні сої збільшилась у 2015 р. на 3,8 %, у 2016 — на 5,4 %, а в 2017 р. - на 10,2 %. Внаслідок цього соя активно конкурує із сегетальною рослинністю за життєвий простір, пригнічуючи її. Застосування комплексів біопрепаратів за умов органічної агротехнології впливало на приріст урожаю сої сорту Сузір'я. На різних варіантах дослідження приріст становив 0,15 – 0,21 т/га, відносно контролю — 8 – 11%. [2].

Виявлено особливості дії біологічних препаратів, створених на основі бактерій *Bacillus subtilis*, *Azotobacter*, *Enterobacter* та *Enterococcus*, на основні

фізіологічні групи ґрунтових мікроорганізмів при вирощуванні рослин сої. Встановлено, що біологічні препарати МікоХелп та ФітоХелп в агрофітоценозі сортів сої Сузір'я та Кент мали безпосередній вплив на основні екологотрофічні групи мікробіому ґрунту, чим підвищували його мікробіологічну активність. За рахунок внесення даних біопрепаратів значно активізувався розвиток мікроорганізмів, які в процесі життя використовують переважно органічні сполуки азоту [3].

Встановлено, що передпосівна інокуляція насіння сої біопрепаратом МікоХелп сприяє приросту урожайності на 6,6-12,3 % (0,18-0,26 т/га). Засвідчено зниження ураження сої септоріозом під впливом обробки по листу Органік-баланс, за чого поширення хвороби знизилось від 90-93 % до 44-53 % [4].

Одним із основних шляхів оптимізації агроєкосистеми в умовах органічного виробництва цієї культури є використання біологічних препаратів на основі азотфіксуєючих та фосформобілізуєючих бактерій. Застосування біопрепаратів сприяє підвищенню стійкості рослин до захворювань, зменшуючи потребу в хімічних пестицидах. Біопрепарати не завдають шкідливого впливу на навколишнє середовище та здоров'я людей, сприяють створенню більш здорового та екологічного аграрного виробництва.

Список використаних джерел:

1. Городиська І.М., Терновий Ю.В., Чуб А.О. Роль біологічних препаратів у органічному землеробстві. Збалансоване природокористування. 2018. № 2. С. 54–58.
2. Городиська І.М., Плаксюк Л.Б., Чуб А.О. Використання біопрепаратів за умов органічного виробництва сої. Вісник аграрної науки. 2018. №9. С. 73–78.
3. Бородай В.В., Косовська Н.А., Парфенюк А.І., Тертична О.В. Вплив біопрепаратів Фітохелп і Мікохелп на мікробіоту ґрунту за вирощування сої (*Glucine max (L.) Merr.*). Агроєкологічний журнал. 2022. №1. С. 99-109.
4. Власюк О. С. Вплив біопрепаратів на фітосанітарний стан посівів пшениці озимої та сої. Проблеми і перспективи фітоімунітету в селекції рослин: тези доп. всеукр. наук.-практ. інтернет-конф. (м. Київ, 10–11 листопада 2022 р.). Київ, 2022. С. 11–12.

| | |
|--|-----|
| <i>Литвинова С.С., Сальнікова А.В.</i> ПОРІВНЯННЯ ВПЛИВУ НА ЕКОСИСТЕМУ ІНТЕНСИВНИХ ТА ОРГАНІЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ ВИРОЩУВАННЯ КУЛЬТУР..... | 156 |
| <i>Ліхтарька У.Я.</i> ІНВЕНТАРИЗАЦІЯ МІСЬКИХ НАСАДЖЕНЬ ГІРКОКАШТАНА ЗВІЧАЙНОГО (<i>AESCLUSUS HIPPOCASTANUTN L.</i>) ДЛЯ ОЦІНКИ ЗЕЛеної ІНФРАСТРУКТУРИ МІСТА СМЛІН..... | 158 |
| <i>Луцук А.С., Стефановська Т.Р.</i> НЕМАТОДИ, ПАРАЗИТУЮЧІ НА РОСЛИНАХ МІСКАНТУСУ ГІГАНТСЬКОГО (<i>MISCANTHUS × GIGANTEUS</i>) ТА ЇХ ВПЛИВ НА ВРОЖАЙНІСТЬ..... | 161 |
| <i>Лобчилов Р.С.</i> БІОІНДИКАЦІЙНА ОЦІНКА ВОДНИХ ЕКОСИСТЕМ..... | 162 |
| <i>Майданович Н.Р., Лобова О.В.</i> ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН <i>SALVIA OFFICINALIS</i> ДЛЯ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i>..... | 164 |
| <i>Мандрица Д.М., Строкаль В.П.</i> ЯКІСТЬ ДЖЕРЕЛА ВОДОПОСТАЧАННЯ РІЧКИ ПІВДЕННИЙ БУТ В РАЙОНІ ВОДОЗАБОРУ ЗА 2020-2023 РОКИ..... | 166 |
| <i>Мартиненко М.Т., Ладика М.М.</i> СУЧАСНИЙ ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН РІЧКИ ЛИБІДЬ..... | 168 |
| <i>Марченко М.С., Сальнікова А.В.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКОСТІ ВОДИ МЕТОДАМИ БІОІНДИКАЦІЇ І БІОТЕСТУВАННЯ..... | 170 |
| <i>Марченко А.О., Строкаль В.П.</i> ЗМІНИ У ДИНАМІЦІ РІЧКИ ДЕРКУЛ ЛУГАНСЬКОЇ ОБЛАСТІ У ПЕРІОД З 2019 ПО 2024 РОКИ..... | 172 |
| <i>Матвієнко А.О., Лобова О.В.</i> ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ВВЕДЕННЯ ТЮЛЬПАНУ В УМОВИ <i>IN VITRO</i>..... | 175 |
| <i>Матюшко С.М.</i> ЗМІНИ КЛІМКІСНОГО ВМІСТУ МАЛОНОВОГО ДІАЛЬДЕГІДУ В ТКАНИНАХ І ОРАГАНАХ КОРОПА ВІДПОВІДЬ НА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА МІКОТОКСИНОМ T2..... | 177 |
| <i>Маценко Я.С., Косовська Н.А., Бородай В.В.</i> АКТИВНІСТЬ КОРЕНЕВИХ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ РОСЛИН <i>GLYCINE MAX L.</i>... | 179 |
| <i>Мекіса Ю.О., Сальнікова А.В.</i> ЗАБРУДНЕННЯ ЕКОСИСТЕМ ПІД ВПЛИВОМ ВИДОБУТКУ КОРИСНИХ КОПАЛИН НА ПРИКЛАДІ ТОВ «ПОЛОВЛІ ПІСОК»..... | 181 |
| <i>Мельник М.В., Боголюбов В.М.</i> БІОРІЗНОМАНІТТЯ І БІОЛОГІЧНА ПРОДУКТИВНІСТЬ ЛІСОВИХ ЕКОСИСТЕМ ТЕРНОПІЛЬСЬКОЇ ОБЛАСТІ..... | 182 |

УДК 601.2:577.121:633.34

АКТИВНІСТЬ КОРЕНЕВИХ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ РОСЛИН *GLYCINE MAX L.*

Маценко¹ Я.С., студентка I курсу ОС Магістр, факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

Косовська Н.А.², аспірантка

Бородай В.В.¹, д.с.-г.н., доцент кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

¹*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

²*Інститут агроекології та природокористування НААН*

Вирощування сої (*Glycine max* (L.) Merr.) є важливою галуззю сільського господарства для багатьох країн світу і відіграє ключову роль в глобальній продовольчій системі, промисловості та економіці. Соя є однією з найбільш продуктивних культур серед бобових, що дозволяє вирощувати велику кількість продукції на гектар і зменшує потребу в великих земельних ділянках для отримання високого врожаю.

Соя має здатність фіксувати азот у ґрунті, так на гектарі площі під посівами сої накопичується 90–120 кг азоту, що прирівнюється до 10–15 т органічних добрив. Одночасно з цим, вирощування сої може впливати на екологічний стан агроценозів, зокрема, змінюючи водний баланс і прискорюючи процеси ерозії. Використання хімічних добрив та пестицидів у вирощуванні сої також може забруднювати ґрунт і водні ресурси [1]. Сучасний екологічний стан навколишнього середовища та постійний вплив людини на природні ресурси вимагають розробки екологічно безпечних методів агропромислового виробництва.

Використання кореневих екзометаболітів сої як альтернативи пестицидам в сільському господарстві представляє собою важливий напрямок в екологічно збалансованому землеробстві.

Метаболіти, які виділяються коренями, складаються в основному з вуглецевих сполук, до яких входять молекули низької молекулярної маси, такі як амінокислоти, органічні кислоти, цукри, фенольні сполуки, фітогормони та інші спеціалізовані метаболіти, а також сполуки високої молекулярної маси, такі як полісахариди та білки. Вони беруть участь у багатьох важливих біологічних процесах, зокрема в забезпеченні поживних речовин, стимуляції росту

кореневої системи, пагонів та репродуктивного розвитку рослин, захисті та сигналіngu до бактерій ризосфери [0, de Souza, A.P., Grandis, A., Zhao, L., et al. (2023). Root exudates shape plant development and adaptation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 74, 257-286].

Кореневі екзометаболіти можуть взаємодіяти з ґрунтовими мікроорганізмами, такими як ризобії, що сприяють збільшенню врожайності та здоров'ю рослин. Ізофлавоїни є ключовими сполуками, які у ролі сигнальних молекул регулюють взаємодію рослин із симбіотичними бактеріями та іншими корисними ґрунтовими мікроорганізмами [Brenes-Arguedas, T., Coley, P.D., & Kursar, T.A. (2022). Plant-microbe interactions shape disease resistance in tropical forests. *Trends Plant Sci.*, 24(2), 166-179.]. Деякі ізофлавоїни, такі як геністеїн і дайдзеїн, мають сильні антиоксидантні властивості, захищаючи рослинні клітини від окислювального стресу, що спричиняється вільними радикалами. Вищезазначені ізофлавоїни характеризуються здатністю підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресів, таких як високі температури, засолення та посуха. Окрім цього, маючи антифунгальні властивості, геністеїн та дайдзеїн сприяють підвищенню стійкості рослин до збудників грибної етіології [Singh, A.P., Sarma, B.K., Singh, H.V., et al. (2022). Phytoalexins in plant defense: current status and future prospects. *J. Plant Pathol.*, 102(1), 29-45.].

Стриголактони, група апокаротіноїдів, активують розгалуження гіфів арбускулярних мікоризних грибів, що підвищує здатність рослин до поглинання води та поживних речовин, покращує їхню стійкість до стресових умов і сприяє загальному росту та розвитку рослини.

Корені сої виділяють тритерпеноїдні сапоніни у великій кількості, які складаються з аглюкону та олігосахаридних залишків. При цьому сапоніни бобових рослин вважаються алелохімікатами і є ключовими компонентами захисту рослин від травоядних тварин, мікробних хвороб або конкурентних рослин [3].

Сапонін Bb, накопичений у ризосфері, стимулює проліферацію обмеженої кількості мікроорганізмів для модулювання мікробної спільноти - родини *Micrococcaceae*, родів *Phenylobacterium* і *Novosphingobium*. Представники роду *Novosphingobium* розкладають поліциклічні ароматичні вуглеводні, є стійкими до пестицидів, що свідчить про участь *Novosphingobium* у деградації органічних речовин у ґрунті та призводить до синтезу поживних речовин, які можуть поглинатися корінням рослин. Існують припущення, що *Novosphingobium* може брати участь у контролі стресу та функціонує як потенційна PGPR бактерія [4].

Для подальшого розвитку даного напрямку необхідно провести додаткові дослідження з механізмів дії корневих екзометаболітів на ріст і розвиток фітопатогенів.

Список використаних джерел:

1. Дідора В.Г. Продуктивність сої залежно від біологічних препаратів та мінеральних добрив у Поліссі України: Наукові горизонти. 2019. № 1. С. 33-39.
2. Van Dam, N. M., & Bouwmeester, H. J. (2016). Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. *Trends in Plant Science*, 21(3), 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>
3. Tsuno Y, Fujimatsu T, Endo K, Sugiyama A, Yazaki K (2018) Soyasaponins: a new class of root exudates in soybean (*Glycine max*). *Plant Cell Physiol* 59: 366–375
4. Fujimatsu T, Endo K, Yazaki K, Sugiyama A. Secretion dynamics of soyasaponins in soybean roots and effects to modify the bacterial composition. *Plant Direct*. 2020;00:1–12. <https://doi.org/10.1002/pld3.259>

| | |
|---|----|
| Гулько Т.С., Бородай В.В. Оптимізація молочнокислих заквасок у молочної промисловості..... | 23 |
| Даневич В. А., Кваско О.Ю. Біотехнологічні методи ідентифікації бактеріозів рослин баклажану (<i>Solanum melongena</i> L.) | 25 |
| Дідур С. О., Прилуцька С. В. Використання вуглецевих наночастинок при вирощуванні зернових культур для підвищення ефективності доставки поживних речовин..... | 27 |
| Діхтяренко О.М., Туровнік Ю.А. Ефективність препаратів Мікохелл та Фітохелл щодо збудника кореневої гнилі зернових культур..... | 28 |
| Заварін М. А., Бойко О.А. Гриб <i>Volvariella volcea</i> у біотехнології: інноваційні можливості для сталого розвитку..... | 30 |
| Зелінська А.В., Нестерова Н.Г. Аспекти посухостійкості декоративних деревних видів рослин як елементів озеленення міст..... | 31 |
| Іванова Т.Д., Коломієць Ю.В. Порівняння двох методів визначення патогенних мікроорганізмів при перевірці безпеки харчової продукції на наявність <i>Campylobacter</i> | 33 |
| Климчук А.І., Таран О.П. Дослідження збереження антигенних властивостей вірусних ізолятів для позитивного контролю в імуноферментному аналізі..... | 34 |
| Коковін М.І, Галузіський М.О, Прилуцька С.В. Регуляція стресостійкості у сільськогосподарських культур вуглецевими частинками за вмістом вторинних метаболітів..... | 35 |
| Кондратюк Д.О., Кваско О.Ю. Бактеріози рослин картоплі <i>Solanum tuberosum</i> L. | 36 |
| Корнілова О.О., Кляченко О.Л. Збереження Клематиса маджурського введеного в культуру <i>in vitro</i> | 37 |
| Косовська Н.А., Маценко Я. С., Яковлева А.С., Бородай В. В. Активність ґрунтових мікроорганізмів у ризосфері <i>Glycine max</i> L. | 39 |
| Костючек О.С., Лобова О.В. Експериментальні дослідження щодо введення верби в культуру <i>in vitro</i> | 41 |
| Кушенко К.С, Кляченко О.Л. Каліногенез гвоздики голландської (<i>Diantus caryophyllus</i> L.) в культурі <i>in vitro</i> | 42 |

УДК 601.2:577.121:633.34

Косовська Н.А.¹, Матенко² Я.С., Яковлева³ А.С., Бородай В. В.²
АКТИВНІСТЬ ҐРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У РИЗОСФЕРІ
GLYCINE MAX L.

¹Інститут агроекології та природокористування НААН, м. Київ, Україна

²Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

³BTU Centre Europe GmbH

e-mail: matsenkoyana20@gmail.com

Вирощування сої (*Glycine max* (L.) Merr.) є однією з ключових галузей рослинництва в багатьох країнах світу, а саме в США, Бразилії, Аргентині та Україні. Соя є важливою продовольчою культурою завдяки високому вмісту білка, антиоксидантів та інших поживних речовин. Окрім цього соя характеризується широким спектром використання в харчовій промисловості. Соя – цінна культура з агрономічної точки зору, за даними IFPRI соя здатна фіксувати від 68 до 334 кг азоту на гектар залежно від умов вирощування. Також вирощування цієї культури призводить до поліпшення фізичних властивостей ґрунту та збільшення кількості гумусу [1].

Вирощування сої сприяє різноманітності ґрунтових мікроорганізмів та їхній активності. Ризосфера, як область ґрунту навколо коренів рослини, є особливо багатою на мікроорганізми. У ризосфері відбуваються активні процеси взаємодії між рослиною і мікроорганізмами ґрунту. Корені сої впливають на ґрунт як фізично, зокрема через свою структуру або теплове випромінювання, так і хімічно, шляхом синтезу різноманітних метаболітів. В свою чергу, коріння рослин виділяють метаболіти в ризосферу двома шляхами: активно - використовуючи енергію АТФ, і пасивно - шляхом дифузії [2]. Метаболіти можуть впливати на склад та активність мікроорганізмів, а також на хімічні властивості ґрунту. Так, у своїх дослідженнях Wei Z. та ін. (2019) показали, що відносна чисельність бактерій родів *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* та грибів родів *Mortierella* і *Chaetomium* значно зросла в ризосферному ґрунті під впливом кореневих виділень сої. Дослідники дійшли висновку, що кореневі екsudати сої є селективним чинником, що формує унікальні ризосферні мікробні угруповання, збагачені корисними мікроорганізмами, такими як бульбочкові бактерії, фіксатори азоту та гриби-мікоризоутворювачі [3].

Соя здатна вступати в ендосимбіотичні відносини з бульбочковими бактеріями чотирьох видів: *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* та *Sinorhizobium fredii*.

Важливу роль у формуванні високих урожаїв сої відіграють бульбочкові бактерії виду *B. japonicum*, які вступають у симбіотичні зв'язки з цією рослиною та забезпечують її біологічним азотом. Недостатня кількість цих бактерій у прикореневій зоні призводить до того, що потенціал симбіозу бобових рослин з бульбочковими бактеріями не використовується повною мірою. При довготривалому існуванні бульбочкових бактерій сої без рослини-хазяїна чисельність їх зменшується, бактерії поступово зникають з мікробного ценозу ґрунту. Передпосівна інокуляція насіння селекційними штамами *B. japonicum* є обов'язковим агроприйомом при її вирощуванні.

Періодичне вирощування культури з використанням біопрепаратів у системах сільськогосподарського виробництва призвело до формування локальних угруповань бактерій у ґрунті [4]. У своїй роботі Alvarenga R. та ін (2019) вивчали вплив інокуляції насіння сої бульбочковими бактеріями *B. japonicum* на урожайність культури в польових умовах. Результати показали, що інокуляція *B. japonicum* призвела до значного підвищення врожайності сої на 12-27% на ділянках з інокульованим насінням [5].

Відомо, що бобові культури за рахунок симбіотичної азотфіксації синтезують та виділяють у ґрунт нейтральні амінокислоти. Ексудати рослини та супутня ґрунтова мікрофлора формують специфічний ензиматичний комплекс, який суттєво впливає на мікробіологічну активність ґрунту, а також на родовий склад та видове різноманіття

мікроміцетів [6]. У кореневій зоні сої домінують переважно токсиноутворювальні види грибів рр. *Aspergillus* і *Penicillium* та види з фітопатогенними властивостями: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* var. *lactis*, *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *Gliocladium* sp., *Verticillium* sp. Токсини грибів знижують рН ґрунтового розчину в ризосфері сої, особливо в умовах сухого клімату, як наслідок, швидкість утворення бульбочок на коренях рослин зменшується і відповідно знижується процес азотфіксації.

Поширення ґрунтових патогенів, таких як *Fusarium* spp. або *Stramenopile* spp., серед посівів сої може призвести до серйозних захворювань та зменшення врожайності. Так, за даними досліджень Olszak-Przybyś, H. (2023) інокуляція тестованими ізолятами *F. oxysporum* знизилася відсоток схожості який дорівнював в середньому 12-24%, порівняно із контролем (83-93%) [7]. У той же час, деякі кореневі та ґрунтові мікроорганізми мають здатність стримувати розвиток патогенів сої, покращувати живлення рослин, сприяти їх росту та підвищувати продуктивність. З цієї причини важливо визначити кількість ґрунтових мікроорганізмів, таких як *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. та актиноміцети, які беруть участь у біологічному контролі ґрунтових патогенів, для загальної оцінки стану ґрунту.

Важливо зберігати рівновагу ґрунтової мікробіоти при вирощуванні сої, щоб підтримувати високий рівень врожайності та якості продукції, а також для збереження здоров'я ґрунту на довготривалу перспективу. Застосування агрономічних практик, таких як ротація культур, використання біологічних препаратів та органічних добрив, може сприяти підтримці різноманітності та активності ґрунтових мікроорганізмів за вирощування сої.

Список використаних джерел:

1. Kumar, R., Kumar, N., Vishwakarma, P., Singh, A.P., Kumar, P., Kumar, V., Jaria, S., Jaiswal, S. (2021). Impact of Soybean on Soil Quality: A Review. *Soil & Tillage Research*, 17(8), 790–799. <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.105126>
2. Massalha, H, Korenblum, E, Tholl, D, Aharoni, A. (2017). Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *Plant J.* 90(4), 788-807. <https://doi.org/10.1111/tpj.13543>
3. Wei, Z., Wan, H., Yang, T., Yang, F., Tian, Y., Jin, C., Yang, G. (2019). Impact of soybean root exudates on the structure of rhizosphere microbial communities. *Plant and Soil*, 436(1), 529–543. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04324-7>
4. Krutylo, D.V. (2022). Symbiotic interaction between a mixture of *Bradyrhizobium japonicum* strains and different soybean cultivars. *Agricultural science and practice*. No.3, 36-48. <https://doi.org/10.15407/agrisp9.03.036>
5. Alvarenga, R.C., Souza, R.A., Maia, P.I., Silveira, P.R., & Araújo, A.S.F. (2019). Effect of *Bradyrhizobium japonicum* inoculation on soybean yield. *Agronomy*, 9(5), 251. <https://doi.org/10.3390/agronomy9050251>
6. Парфенюк А.І., Косовська Н.А., Бородай В.В., Туровнік Ю.А., Кореневі екзометаболіти, як екологічний чинник у взаємодії культурних рослин з ґрунтовими мікроорганізмами *Агроєкологічний журнал*. 2022. № 3. С. 62–74. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.3.2022.266410>
7. Olszak-Przybyś, H., Korbecka-Glinka, G., Patkowska, E. Identification and Pathogenicity of *Fusarium* Isolated from Soybean in Poland. *Pathogens* 2023, 12, 1162. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091162>