

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО

**Декан факультету захисту рослин,
біотехнології та екології**

_____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**
« ____ » _____ 2026 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

**Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття**

_____ **Олена КВАСКО**
« ____ » _____ 2026 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «Застосування сучасних біотехнологічних підходів у формуванні
стійкості *Glycine max* (L.) Merr. до бактеріальних хвороб»**

Спеціальність: **162 «Біотехнології та біоінженерія»**

Освітньо-професійна програма **«Біотехнології та біоінженерія»**

Гарант освітньої програми

Кандидат біол. наук, доцент

(підпис)

Олена КВАСКО

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

Доктор с.-г. наук, професор

(підпис)

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

Виконала

(підпис)

Катерина ШЕПЕЛЯ

КИЇВ – 2026

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізнноманіття**

к.б.н., доцент

_____ **Олена КВАСКО**

«_____» _____ 2026 р.

**З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ роботи
здобувачу**

Шепелі Катерині Миколаївні

Спеціальність **162 «Біотехнології та біоінженерія»**

Освітньо-професійна програма **«Біотехнології та біоінженерія»**

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: **«Застосування сучасних біотехнологічних підходів у формуванні стійкості *Glycine max* (L.) Merr. до бактеріальних хвороб»**

Затверджена наказом ректора НУБіП України від «30» жовтня 2025 р. №. 2596 «С».

Термін подання завершеної роботи на кафедру: 15 травня 2026 р.

Вихідні дані до роботи: насіння сої звичайної (*Glycine max*.), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Провести аналіз мікрофлори насіння сої сорту «Золушка».
2. Дослідити особливості калюсогенезу *in vitro*.
3. Здійснити відбір клітинних ліній, резистентних до фітопатогенів.
4. Оцінити ефективність хімічних та біопрепаратів проти *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Перелік графічних документів: рисунки, таблиці.

Дата видачі завдання: «30» жовтня 2025 р.

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

(підпис)

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

Завдання взяла до виконання

(підпис)

Катерина ШЕПЕЛЯ

РЕФЕРАТ

Бакалаврська кваліфікаційна робота виконана на 47 сторінках, містить 4 таблиці, 21 рисунок та використано 45 літературних джерела.

Ключові слова: *GLYCINE MAX* (L.) MERR., КЛІТИННІ ЛІНІЇ, *IN VITRO*, *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PHASEOLICOLA*, БІОПРЕПАРАТИ, СТІЙКІСТЬ.

Актуальність дослідження: нинішній стан світового аграрного сектору виокремлюється стрімким зростанням ролі сої (*Glycine max* (L.) Merr.), як ключової культури, що забезпечує досить таки значну частину глобальної продовольчої стійкості через високий вміст рослинного білка та олії. Однак виробництво продуктів з рослин сої зіштовхується з серйозними проблемами, серед яких бактеріальні хвороби займають провідну позицію за рівнем шкідливості. В умовах глобальних кліматичних змін, що супроводжується різкими коливаннями температури та нерівномірними опадами, спостерігається помітне збільшення чисельності випадків зараження такими двома основними збудниками, як *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* та *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycinea*. Тому використання сучасних біотехнологічних підходів у формуванні стійкості сої є потенційно важливим для мінімізації негативного впливу патогенів на врожай.

Метою дослідження було дослідження комплексного аналізу та теоретичного обґрунтування застосування сучасних біотехнологічних методів для підвищення стійкості *Glycine max* (L.) Merr. до найбільш поширених бактеріальних хвороб.

Об'єктом дослідження – оцінка стійкості клітинних ліній сої до бактеріальних патогенів родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas* у системі *in vitro*, процеси формування захисної відповіді до патогенів в культурі *in vitro*

Предметом дослідження – насіння сої звичайної (*Glycine max*.), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Методи дослідження: мікробіологічний (аналіз мікрофлори насіння), калюсної культури та метод паперових дисків.

Abstract

The bachelor's qualification work consists of 47 pages, contains 4 tables, 21 figures, and cites 45 literary sources.

Keywords: *GLYCINE MAX* (L.) MERR., CELL LINES, *IN VITRO*, *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PHASEOLICOLA*, BIOPREPARATIONS, RESISTANCE.

Relevance of the research: the current state of the global agricultural sector is characterized by the rapidly growing role of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as a key crop that provides a significant part of global food security due to its high content of plant protein and oil. However, the production of soybean products faces serious challenges, among which bacterial diseases occupy a leading position in terms of harmfulness. Under conditions of global climate change, accompanied by sharp temperature fluctuations and uneven precipitation, a noticeable increase in the number of infection cases by two main pathogens – *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* – is observed. Therefore, the use of modern biotechnological approaches to form soybean resistance is potentially important for minimizing the negative impact of pathogens on yield.

The aim of the study was a comprehensive analysis and theoretical substantiation of the application of modern biotechnological methods to increase the resistance of *Glycine max* (L.) Merr. to the most common bacterial diseases.

The object of the study is the assessment of the resistance of soybean cell lines to bacterial pathogens of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas* in the *in vitro* system, as well as the processes of formation of the protective response to pathogens in *in vitro* culture.

Subject of the study: seeds of common soybean (*Glycine max*) and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Research methods: microbiological (analysis of seed microflora), callus culture, and the paper disk method.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Агрономічне значення сої (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	8
1.2. Основні бактеріальні патогени сої та симптоматика хвороб	9
1.3. Природні механізми захисту та генетика стійкості рослин до фітопатогенів	11
1.4. Традиційні та біотехнологічні методи селекції сої на стійкість до хвороб	12
1.5. Використання мікробних препаратів та еліситорів як елемент сучасних біотехнологій	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	16
2.1. Об'єкт дослідження.....	16
2.2. Аналіз мікрофлори насіння сої	17
2.3. Одержання первинного калюсу сої	18
2.4. Відбір клітинних ліній резистентних до фітопатогенних бактерій	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
3.1. Аналіз мікрофлори насіння сої	24
3.2. Особливості калюсогенезу <i>in vitro</i>	30
3.3. Оцінка стійкості клітинних ліній до бактеріальних патогенів	34
3.4. Ефективність впливу фунгіцидів на збудників бактеріальних хвороб сої	36
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42

ВСТУП

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) є однією з найважливіших сільськогосподарських культур світу. Вона забезпечує вагомую частину рослинного білка та олії для харчування людей, кормів тварин і промислового використання. Соя є універсальною культурою, бо окрім вищезазначених, ще й має екологічне застосування. Вирощування цієї культури у сівозмінні з зерновими дає можливість вирішити проблему родючості ґрунту. Таким чином, завдяки своїм характеристикам соя займає лідируючі позиції у світовому вирощуванні олійних культур. Однак її врожайність суттєво знижується біотичними факторами, зокрема бактеріальними хворобами, які спричиняють чималі втрати врожаю в різних регіонах вирощування. Найбільш шкодочинними хворобами сої є кутааста плямистість листя, збудником якої є *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*; та пустульний бактеріоз, збудник *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycinea*. Ці хвороби проявляються у вигляді пошкодження листя та зниження фотосинтетичної активності, що в результаті призводить до зменшення якості та врожаю насіння.

Традиційні методи боротьби з бактеріальними хворобами сої, такі як застосування хімічних препаратів та агротехнічні методи, часто є недостатньо ефективними. Патогени швидко розвивають резистентність, а хімічні засоби негативно впливають на навколишнє середовище. Саме тому пошук альтернативних біотехнологічних підходів для підвищення стійкості сої до патогенів є актуальним.

У цій роботі основним експериментом є оцінка стійкості клітинних ліній сої до бактеріальних патогенів *in vitro* методом клітинної селекції. Встановлення ефективності застосування хімічних та біопрепаратів, антибіотиків щодо пригнічення росту *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Агрономічне значення сої (*Glycine max* (L.) Merr.)

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) – однорічна трав'яниста рослина родини *Fabaceae* (*Leguminosae*), яка походить зі Східної Азії. Рослина має прямостояче, кущисте стебло заввишки до 1,5 м залежно від сорту та умов вирощування. Коренева система стрижнева з добре розвиненими бічними коренями, досягає глибини до 2 м. Основна маса коренів зосереджена в верхніх 15 см ґрунту. На коренях утворюються бульбочки з азотфіксуючими бактеріями *Bradyrhizobium japonicum*. Листки переважно трійчасті. Квітки дрібні зібрані в китиці, мають забарвлення білого, рожевого або фіолетового кольору. Плоди сої це боби довжиною 2-7 см, що містять приблизно по 2-5 насінин. Насінини мають форму овалу або кулі, в основному жовтого кольору з характерним рубчиком (*hilum*). Соя рослина з детермінантним або індетермінантним типом росту. Вона проходить вегетативні та репродуктивні стадії розвитку [1, 2].

Соя є теплолюбною культурою, оптимальна температурою росту 25°C. Потребує достатньої вологи, особливо в період цвітіння та дозрівання. Біологічні особливості включають фотоперіодичну чутливість та високу пластичність до різних кліматичних зон [1].

Соя є однією з найважливіших стратегічних культур у світі завдяки високому вмісту білка (35-50%) та олії (17-27%) в насінні. Лідерами виробництва є Бразилія, США, Аргентина та Китай. Соя забезпечує значну частину рослинного білка для кормів тваринництва та харчової промисловості, а також використовується як сировина для біопалива та промислових продуктів [3]. Завдяки азотфіксації соя покращує ґрунтову родючість і є ключовим елементом сівозмін.

В Україні соя посідає провідне місце серед олійних культур. За даними USDA, посівні площі під соєю стабільно становлять близько 2,3 млн га [4]. Соя є важливим експортним продуктом і сировиною для переробки, що сприяє

розвитку вітчизняного агровиробництва завдяки адаптивним сортам та зростанню попиту на білкові корми.

Врожайність сої суттєво знижують абіотичні стреси, такі як посуха (зменшення врожаю до 50 %), надмірне зволоження, екстремальні температури, засолення ґрунту та дефіцит поживних речовин. Посуха в репродуктивний період особливо критична, оскільки порушує фотосинтез, налив насіння та призводить до опадання квіток і бобів [5].

Біотичні стреси включають бактеріальні хвороби, грибні інфекції, вірусні захворювання та шкідників [5]. Ці фактори підкреслюють актуальність створення стійких сортів за допомогою сучасних біотехнологічних підходів.

1.2. Основні бактеріальні патогени сої та симптоматика хвороб

Серед основних бактеріальних патогенів сої провідне місце посідають *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, який спричиняє бактеріальний опік, та *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, що викликає бактеріальну пустулу. Ці бактерії поширені в усіх основних регіонах вирощування сої. Вони проникають у рослину через продихи або механічні пошкодження (град, вітер, дощ) [7]. Бактеріальні хвороби сої розвиваються за умов теплої вологої погоди (оптимально 25-33 °C з високою відносною вологістю). Інші бактеріальні патогени зустрічаються рідше, але також можуть спричиняти системні ураження.

Бактеріальний опік сої, спричинений *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* є одним з найпоширеніших бактеріальних захворювань. Проявляється переважно на листках середнього та верхнього ярусу. Ураження починаються з дрібних, кутових, водянистих плям, які швидко набувають жовто-коричневого або темно-коричневого кольору з характерним жовто-зеленим ореолом. Плями зливаються в великі некротичні ділянки. Тканина відмирає та випадає, що надає листкам «рваного» вигляду. Ураження може поширюватися на боби та стебла, викликаючи деформацію та зниження якості насіння. Хвороба особливо інтенсивно розвивається після грозових дощів з сильним вітром (22-27°C). Патоген зимує в

рослинних рештках та інфікованому насінні, а поширення посилюється сильними дощами з вітром, що створюють мікротравми [8, 9].

Бактеріальна пустула сої, викликана *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* частіше проявляється в середині та другій половині вегетаційного періоду. Характеризується дрібними світло-зеленими плямами з піднятими центрами на обох поверхнях листка. У центрі плям утворюються характерні світлі пустули, особливо виражені на нижній стороні листка. Плями оточені жовто-зеленим ореолом, зливаються в великі неправильної форми некротичні зони, після чого тканина може розриватися. На бобах з'являються дрібні підняті плями. Хвороба найбільш поширена за теплої вологої погоди (30-33 °C) і може призводити до передчасного опадання листя [6, 10].

Крім основних патогенів, певну загрозу становить *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, який спричиняє бактеріальну плямистість та системне в'янення. Симптоми включають жовто-коричневі плями на листках із прожилковим малюнком, міжжилковий некроз та хвилеподібні ураження. У тяжких випадках спостерігається в'янення цілих рослин через закупорку судин ксилеми, що призводить до системного поширення бактерії. Цей патоген передається з насінням і може викликати значні втрати в умовах високої вологості. Симптоми посилюються за умов стресу вологою або посухою, а ураження може нагадувати інші бактеріальні або грибні хвороби. Хоча економічні втрати від цього патогена на сої менші, його поява в нових регіонах (Африка та Європа) робить його актуальним для моніторингу [11].

Загалом бактеріальні хвороби сої не лише безпосередньо знижують фотосинтетичну поверхню та якість насіння, але й створюють умови для вторинних інфекцій грибними патогенами через пошкоджені тканини. Економічний вплив може сягати значних втрат у врожаї, особливо в регіонах з інтенсивними опадами. Аналіз симптоматики та біології цих патогенів підкреслює обмеженість традиційних методів захисту і необхідність застосування сучасних біотехнологічних підходів, таких як CRISPR/Cas9-

редакція генів стійкості, маркер-асистована селекція та трансгенез, для створення стабільної резистентності до бактеріальних хвороб сої.

1.3. Природні механізми захисту та генетика стійкості рослин до фітопатогенів

Рослини, у тому числі соя, еволюційно сформували багатопланову систему захисту від фітопатогенів, зокрема бактеріальних (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), яка поєднує пасивні (структурні) та активні (біохімічні) механізми, генетичний контроль через R-гени та системну набуту стійкість, а також динамічну взаємодію в системі «рослина-господар-патоген».

Пасивний захист сої є першою лінією оборони і полягає в преформованих фізичних бар'єрах, присутніх ще до контакту з патогеном. До них належать кутикула, восковий наліт на поверхні листків, міцна клітинна стінка, епідермальний шар, стоми та трихоми. Ці структури механічно перешкоджають проникненню бактерій через природні отвори або пошкодження. У сої зміцнення клітинної стінки шляхом лігніфікації та відкладення каллоза також діє як пасивний структурний бар'єр [12].

Активний захист спрацьовує після розпізнавання патогена і включає швидкі біохімічні реакції. Серед них – генерація реактивних форм кисню, синтез патогенез-асоційованих протеїнів (PR-протеїнів, зокрема β -1,3-глюканаз) та накопичення фітоалексинів. У сої ключовим фітоалексином є гліцеолін–ізофлавоноїд фенілпропаноїдного шляху, який проявляє антимікробну дію, порушуючи мембрани та метаболізм бактерій. Активний захист також супроводжується гіперчутливою реакцією та змінами експресії генів, що обмежують поширення інфекції [12].

Генетичний контроль стійкості у сої значною мірою залежить від R-генів. Ці гени кодують рецептори, які розпізнають ефектори бактерій за принципом «gene-for-gene». У сої до бактеріального опіку відомі гени Rpg1-b, Rpg1-r, Rpg2, Rpg3 та Rpg4, а до бактеріальної пустоли – QTL, зокрема локус ghr. Коли R-ген

спрацьовує, запускається ефектор-індукований імунітет, яка часто призводить до локального некрозу і зупиняє патоген [13]. Це вже рівень генетики, який дає специфічну стійкість.

Системна набута стійкість (SAR) забезпечує тривалий захист по всій рослині після першої інфекції. У сої регулюється ортологами гена NPR1 (GmNPR1-1 і GmNPR1-2), які активують саліцилат-залежний шлях і PR-гени. Дослідження свідчать, що після зараження *Phytophthora sojae* соя стає стійкішою і до бактеріального патогена *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Системна набута стійкість діє не локально, а системно, тому це важливий механізм для довгострокового захисту [14].

Взаємодія в системі «рослина-господар – патоген» найкраще пояснює модель «zigzag» (Jones & Dangl). Спочатку рослина розпізнає PAMPs (наприклад, флагелін) рецепторами PRR і запускає PAMP-індукований імунітет. Бактерії сої через type III secretion system вводять ефектори, які пригнічують PAMP-індукований імунітет і викликають спричинену ефекторами сприйнятливість. У відповідь соя використовує R-гени для ефектор-індукованого імунітету, що відновлює захист і часто дає гіперчутливу реакцію. У сої вивчено конкретні ефектори AvrB, AvrRpm1 та Хор-протеїни *Xanthomonas*, які модулюють гормони і транскрипцію [15, 16].

Природні механізми захисту сої дають хорошу основу для розуміння, як саме можна покращувати стійкість біотехнологічними методами. Наприклад, через редагування R-генів чи активацію системи набутої стійкості.

1.4. Традиційні та біотехнологічні методи селекції сої на стійкість до хвороб

Традиційна селекція довгий час була основним інструментом, але її обмеження змушують звертатися до сучасних біотехнологічних підходів. Комбінація класичних і молекулярних методів дозволяє створювати сорти зі стабільною стійкістю, що є ключовим для підвищення врожайності в умовах змін клімату та еволюції патогенів.

Обмеженість методів класичної селекції у боротьбі з бактеріозами проявляється насамперед у тривалості процесу та низькій ефективності проти швидко мутуючих бактерій. Класична селекція включає гібридизацію, багаторазові схрещування та фенотиповий відбір у польових умовах, що займає 6-12 років на створення одного комерційного сорту [23]. При цьому часто відбувається чеплене успадкування - перенесення небажаних генів, які знижують врожайність або якість насіння. Для бактеріальних хвороб сої ситуація ускладнюється тим, що патогени (*Pseudomonas* та *Xanthomonas*) швидко набувають нових рис. Дослідження показують, що хоча класичні методи успішно ввели рецесивний ген *gxr* для бактеріальної пустоли та R-ген *Rpg* для опіку, вони не забезпечують широкого спектра та тривалої стійкості через обмежену генетичну різноманітність ліній [17, 18].

Крім того, класична селекція сильно залежить від погодних умов і природного прояву хвороби, що робить відбір ненадійним. У теплих і вологих регіонах бактеріальна пустола розвивається швидко. Холодна погода сприяє бактеріальному опіку, тому польові випробування часто дають суперечливі результати. Це призводить до втрати часу та ресурсів, а також до того, що нові сорти можуть втратити стійкість вже через кілька сезонів через еволюцію патогена [17, 18].

Застосування методів культури *in vitro*. Клітинна селекція на стійкість до токсинів патогенів дає можливість проводити штучний відбір стійких клітин або тканин у контрольованих умовах пробірки, використовуючи токсини бактерій як селективний фактор. Цей підхід значно прискорює процес порівняно з польовими випробуваннями. З калюсної тканини сої можна отримати тисячі варіантів, які потім регенерують у цілі рослини. Для бактеріальних хвороб сої застосовують культуральні фільтрати патогенів або очищені токсини, які імітують дію хвороби на клітинному рівні. Клітини, що виживають у токсичному середовищі, часто мають змінену експресію генів захисту. Найбільшою перевагою методу є незалежність від сезону та економічність. Однак потрібна

подальша перевірка в польових умовах, бо не всі зміни стабільно передаються[19].

На практиці клітинна селекція *in vitro* дозволяє створювати варіанти сої з підвищеною стійкістю до токсинів *Pseudomonas* або *Xanthomonas* без ризику зараження цілої рослини. Метод особливо корисний для бактеріальних хвороб, бо токсини бактерій часто діють на рівні клітинної стінки чи мембран, і відбір відбувається на ранніх етапах [19].

Використання ДНК-маркерів, як молекулярно-генетичних підходів для ідентифікації генів стійкості радикально прискорюють процес. Вони дозволяють відбирати потрібні гени чи QTL прямо на рівні ДНК, не чекаючи прояву хвороби в полі. У сої така селекція успішно застосовується для маркування Rpg1-b, Rpg1-r, Rpg2-4 (для бактеріального опіку) та локусу ghr (для бактеріальної пустоши). Це дає змогу пірамідувати кілька генів стійкості в одному генотипі, створюючи сорти з широким спектром захисту. Метод особливо ефективний для кількісних ознак, де фенотип сильно залежить від середовища. Перевагою методу є економія часу, зменшення витрат на польові випробування та уникнення зчепленого успадкування небажаних ознак [18, 20].

Генетична інженерія та редагування геному (CRISPR/Cas9). Створення трансгенних та цисгенних ліній із посиленням імунітетом відкривають революційні можливості для точного втручання в геном сої. Трансгенні лінії створюють з введенням чужорідних генів антимікробних пептидів чи PR-протеїнів. Цисгенні - з використанням тільки власних генів сої. CRISPR/Cas9 дозволяє «вимикати» гени сприйнятливості або точково змінювати R-гени без залишкової чужорідної ДНК. Для бактеріальних хвороб сої перспективно редагувати мішені ефекторів (AvrB, AvrRpm1) або NLR-рецептори. Метод вже успішно застосований для підвищення стійкості сої до інших патогенів, і стратегії легко адаптувати до *Pseudomonas* та *Xanthomonas* [21, 22].

1.5. Використання мікробних препаратів та еліситорів як елемент сучасних біотехнологій

Роль біопрепаратів на основі антагоністів (бактерій-гіперпаразитів) у стримуванні бактеріозів полягає в тому, що корисні бактерії (наприклад, *Bacillus* spp. та *Pseudomonas* spp.) колонізують ризосферу або листя сої і діють як гіперпаразити або антагоністи. Вони виробляють антимікробні сполуки, конкурують за поживні речовини та простір. Також можуть паразитувати на клітинах патогенних бактерій. У сої штам *Pseudomonas parafulva* JBCS1880 показав сильну антагоністичну активність проти *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, пригнічуючи ріст бактеріальної пухлякості як у лабораторних, так і в польових умовах [26]. Такі препарати на основі *Bacillus velezensis* або *Pseudomonas* spp. зменшують ураження хворобами і одночасно стимулюють ріст рослини [24, 25].

Перевага таких біопрепаратів у тому, що вони діють відразу кількома механізмами - антибіоз, конкуренція та індукція імунітету. Наприклад, штамми *Bacillus subtilis* та *Pseudomonas fluorescens* ефективно контролюють *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* на листі сої, зменшуючи симптоми опіку. Це особливо важливо для органічного землеробства, бо не залишає хімічних залишків [27].

Застосування індукторів стійкості (еліситорів) для активації власних захисних сил рослини дозволяє покращити імунітет сої без генетичних змін. Еліситори - це молекули (хітозан, саліцилова кислота, ліпополісахариди бактерій, флагелін), які запускають системну набуту стійкість або індуковану системну стійкість. У сої обробка еліситорами з *Pseudomonas fluorescens* підвищує рівень PR-протеїнів, ROS і фитоалексинів, що робить рослину менш сприйнятливою до фітопатогенів. Це швидкий і безпечний спосіб, який діє протягом усього вегетаційного періоду [28, 29].

На практиці застосування еліситорів це обробка насіння або обприскування листя. Дослідження показують, що хітозан та бактеріальні еліситори зменшують ураження бактеріальною пухлякостю і при цьому покращують якість насіння [28, 30].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження було обрано насіння сої звичайної (*Glycine max.*) сорту «Золушка». Використання даного сорту спричинена його біологічними властивостями, то ж він є типовим представником для дослідження механізмів формування стійкості до бактеріальних захворювань.

«Золушка» – є ранньостиглим сортом універсального та харчового призначення, вегетаційний період якого складає 105-110 днів [42]. Характеризується детермінантним типом росту, висота кріпосення нижнього стручка приблизно 12 см. Насіння має овальну форму середнього розміру, а забарвлення оболонки в основному жовте, колір рубчика – чорний. Олійність досягає 21-21,5%, вміст сирого протеїну в насінні 39-40,5% (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Маркування насіння сої сорту «Золушка» та загальний вигляд насіння.

Цей сорт гарно адаптується до різноманітних кліматичних умов вирощування, був виведений Інститутом сільського господарства Степу НААН України, у Державному Реєстрі сортів рослин України з 2014 року [39].

2.2. Аналіз мікрофлори насіння сої

Аналіз мікрофлори насіння сої проводили з метою виявлення та кількісної оцінки бактеріальних угруповань, зокрема потенційно патогенних форм, що можуть впливати на стійкість рослин до бактеріальних хвороб.

Попередньо було відібрано без видимого пошкодження насінини у кількості 100 штук.

Перед початком дослідження провели підготовку насіння, щоб відокремити внутрішню інфекцію від випадкового поверхневого забруднення. Насіння сої стерилізували в слабкому мильному розчині (0,5-1%). Для цього його поміщали в стерильний скляний стакан, заливали 100-150 мл мильного розчину. Далі замочували на 10 хв при постійному обережному перемішуванні на магнітній мішалці при кімнатній температурі, уникаючи механічного пошкодження насіння. Така обробка дозволила видалити поверхневі забруднення, частину мікрофлори та пил без сильного впливу на внутрішню мікробіоту насіння. Наступним етапом було ретельне промивання стерильною дистильованою водою три рази по 10 хвилин для видалення детергенту.

Після промивання насіння помістили на стерильні паперові фільтри у ламінарному боксі, щоб забрати надлишок води.

Для аналізу використовували голодний агар (water agar) [38]. Середовище готували шляхом розчинення 3 г агару в 200 мл дистильованої води. Суміш ретельно перемішували на магнітній мішалці з підігрівом до повного розчинення агару.

Далі проводилося автоклавування при 121°C протягом 15-20 хвилин, після охолодження розлили в десять стерильних чашок Петрі (приблизно по 20 мл на чашку). Чашки залишили для застигання при кімнатній температурі в ламінарному боксі.

У кожену чашку Петрі рівномірно розклали по 10 насінин за допомогою стерильного пінцета. При посадці дотримувались достатньої дистанції між ними, запобігаючи перекриттю та злиттю майбутніх колоній мікроорганізмів (рис. 2.2).

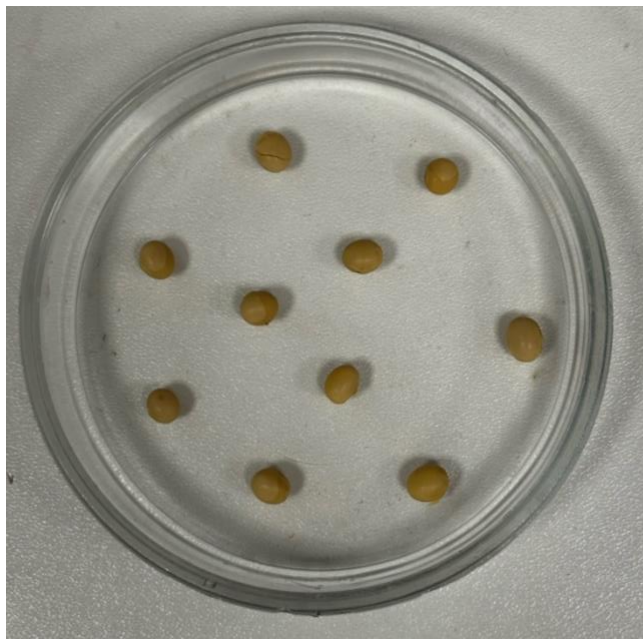


Рис. 2.2. Приблизне розташування насінин на поверхні чашки Петрі.

Чашки з насінням герметизували та помістили у термостат з температурним режимом $27 \pm 1^\circ\text{C}$, що є оптимальним для активісного росту та спороношення більшості представників патогенної та сапрофітної мікрофлори сої.

Через 4-6 діб перевірили результати проростання колоній мікроорганізмів.

За морфологічними і культуральними характеристиками відібрали збудника. Форму, розмір і колір колоній визначали через 48 годин росту на чашці з голодним агаром за температури 28°C . Проводили фарбування за Грамом з використанням набору IVD фірми Merck. Аналіз рухливості мікроорганізмів здійснювали у препараті «роздавлена крапля», виготовленого з одnodобової культури. Мікроскопічний аналіз виготовленого препарату проводили за допомогою мікроскопа Sigeta MB-201 із застосуванням імерсійної системи.

2.3. Одержання первинного калюсу сої

Одержання первинного калюсу з насіння сої проводили з метою отримання недиференційованої калюсної тканини задля подальшого вивчення біотехнологічних підходів підвищення стійкості рослини до бактеріальних хвороб.

Спочатку для одержання первинного калюсу відібрали ціле, здорове на вигляд насіння сої. Далі насіння сої промили в проточній воді для видалення поверхневого пилу і забруднень. Потім проводили стерилізацію в розчині Білизни (співвідношення 1:2 з дистильованою водою). Насіння поміщали в стерильний стакан і заливали свіжим розчином Білизни і тримали протягом 20 хвилин при кімнатній температурі [35]. Періодично перемішували.

Після стерилізації насіння ретельно промили дистильованою водою 4-5 рази, для повного видалення залишку хлору. Далі насіння просушили на паперових фільтрах у ламінарному боксі.

Для цього дослідження було застосовано базове живильне середовище Мурасіге-Скуга [36].

Приготування живильного середовища Мурасіге-Скуга на 1 л:

- 1) У хімічний стакан об'ємом 1000 мл налити приблизно 200 мл дистильованої води. Помістити всередину магнітний якір та встановити посудину на магнітну мішалку. Увімкнути перемішування на середній швидкості.
- 2) Додати 50 мл макросолей MS; 50 мл розчину $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 мл мікросолей MS; 50 мкл інозиту; 2,5 мл Fe-хелату.
- 3) Додати розчини вітамінів – 0,5 мл вітамінів MS.
- 4) Додати фітогормони – 0,1 мл 2,4-Д та 1,0 мл 6-БАП.
- 5) Додати наважку сахарози (15 г). Після повного розчинення компонентів довести об'єм розчину дистильованою водою до 400-450 мл (залишаючи місце для агару).
- 6) Виміряти рН отриманого розчину. Значення має становити 5,6-5,8. Для корекції використовувати 0,1N розчини КОН або HCl, додаючи їх мікропіпеткою по краплях.
- 7) Наважку агару (4,0 г) помістити у термостійку ємність і залити невеликою кількістю холодної води та залишити на 20 хв для набухання. Після цього нагріти суміш до повного розчинення агару.
- 8) З'єднати розчин компонентів із розчиненим агаром і довести загальний об'єм дистильованою водою точно до 1000 мл, ретельно перемішати. Тепле

середовище розлити у пробірки або колби, закрити фольгою. Стерилізувати в автоклаві при тиску 1,2 атм та температурі 105-110°C.

Далі у кожену підготовлену пробірку з середовищем Мурасіге-Скуга за допомогою стерильного пінцета помістили по одній насініні сої. Насініну заглиблювали в агар на 1/3-1/2 її довжини. Всього використовували 10 пробірок і 10 насінін (по 1 насініні на 1 пробірку).

Такий порядок дій: пробірку відкривають, переносять насіння, намагаючись скоротити час маніпуляції, і швидко закривають отвір пробірки фольгою (рис. 2.3.).

Пробірки з насінням поміщали у культуральну шафу і культивували за температури $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ та освітленні 400 лк.

Через 4-7 діб перевіряють чистоту посіву та схожість насіння.



Рис. 2.3. Розміщенні пробірки в культуральній шафі.

Наступним етапом одержання первинного калюсу з асептичних експлантів:

1) Стерильним пінцетом виймають рослину з пробірки (рис. 2.4.) і кладуть в стерильну чашку Петрі.

2) Притримують пінцетом, стерильним скальпелем розрізають рослину на експлантати: черешки, листові пластинки, фрагменти стебла, кореня. На листках роблять додаткові надрізи на центральній жилці.

3) Експлантати культивують на калюсогенному середовищі у флакончиках (рис. 2.5.), які підписують з найменуванням типу експлантата.

4) Культивують у темряві при $+25 - 26,5^{\circ}\text{C}$. Їх субкультивування проводять через кожні 3-4 тижні і визначають частоту калюсогенезу як відношення кількості експлантатів з калюсом до загальної кількості висаджених експлантатів у відсотках (О.Л. Кляченко, Ю.В. Коломієць, О.В. Субін, 2023 рік).



Рис. 2.4. Етап підготовки асептичного експлантату перед висадкою на поживне середовище.



Рис. 2.5. Експлантат на агаризованому живильному середовищі.

2.4. Вибір клітинних ліній резистентних до фітопатогенних бактерій

Першим етапом роботи було одержання клітинної суспензії:

1) Для цього пухкий первинний калюс (розміром 5-10 мм) переносять в стерильні колби з 40-50 мл рідкого MS-середовища. Середовище без агару, містить 2-5 мг/л 2,4-Д.

2) Суспензію інкубують на орбітальному шейкері (100-120 об/хв) при температурі 24-27°C протягом 5-7 діб.

З метою оцінки стійкості сорту сої «Золушка» до бактеріальної плямистості як селективний фактор використовували суспензію бактеріальних клітин (концентрація – 20 млрд кл./мл), попередньо прогріту протягом 2,5 годин за температури 100 °C.

Селекцію калюсних клітин сої здійснювали шляхом додавання до поживного середовища селективних чинників у градієнті концентрацій: 0,4; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0 та 10,0%. Інкубацію проводили в темряві за температури 25 ± 2 °C. Через 4 тижні культивування оцінювали такі показники, як приріст маси калюсу та кількість життєздатних колоній (Буценко, Коломієць, 2019).

2.5. Визначення чутливості мікроорганізмів до різних концентрацій препаратів методом дифузії в агарі

1) На поверхню попередньо приготованих чашок з картопляним агаром рівномірно висівають суспензію фітопатогенної бактерії методом газону за допомогою стерильного шпателя Дрігальського (С.М. Тетеріна, Н.М. Грегірчак, В.О. Красінько, 2013). Було взято штам «9066» із колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного (наданий співробітником відділу фітопатогенних бактерій д.б.н., доцент Буценко Л.М.). Бактерія – *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

2) За допомогою стерильного коркового свердла роблять чотири лунки. Перша лунка – розведення 1:1; друга – 1:2; третя – 1:4; четверта – контроль (стерильна водопровідна вода). За допомогою стерильних знімних носиків додавали біологічні та хімічні препарати у

рекомендованих виробником концентраціях (табл. 2.1). Для антибіотиків: за допомогою стерильного пінцета на поверхні поживного середовища розміщують три паперових диски.

Таблиця 2.1.

Розрахунок концентрацій та пропорцій біопрепаратів і фунгіцидів для лабораторних досліджень

№	Препарат	Рекомендована концентрація (1:1)	1:2	1:4
1	Фітохелп	0,15/10 мл	0,5/0,5	0,5/0,5
2	Фітоцид	0,2/10 мл	0,5/0,5	0,5/0,5
3	Казумін	0,01/10 мл	0,5/0,5	0,5/0,5
4	Артемікс	0,06/10 мл	0,5/0,5	0,5/0,5
5	Медян	0,05/10 мл	0,5/0,5	0,5/0,5
6	Амістар	0,02/10 мл	0,5/0,5	0,5/0,5

Антибіотики:

На першому диску – стрептоміцин;

на другому диску – пеніцилін;

на третьому диску – тетраміцин;

на четвертому диску – диск контроль.

Відстань від диска до краю чашки має бути 1,5-2,0 см, а між дисками повинна бути 2,5-3,0 см.

3) Одразу після аплікації дисків чашки Петрі помістили в термостат. Інкують при температурі 28°C протягом 18-24 год.

4) Після інкубації вимірюють діаметр зон інгібування росту бактерій (у мм) навколо кожного диска.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Аналіз мікрофлори насіння сої

Аналіз мікрофлори насіння сої проводився з метою виявлення бактеріальних угруповань. Зокрема встановити потенційно патогенні форми бактерій, які впливають на стійкість сої до бактеріальних захворювань.

Для дослідження було відібрано 100 візуально здорових, неушкоджених насінин сої.

Першу перевірку провели на 4 добу інкубації. На всіх чашках Петрі не спостерігалось жодних видимих колоній мікроорганізмів навколо насінин (рис 3.1.). Насінини виглядали чистими, без ознак бактеріального або грибного росту. У деяких чашках відзначалося початкове набухання та розтріскування шкірки насіння, що є нормальним фізіологічним процесом проростання. Спостерігалось проростання насіння але не на всіх чашках. На момент огляду насіння проросло в 9 чашках, на 1 чашці жодної насінини не проросло.

Відсутність мікробного росту на цьому етапі свідчить про ефективність поверхневої обробки насінин. Також можна зробити висновок про низький рівень епіфітної мікрофлори взятого насіння.

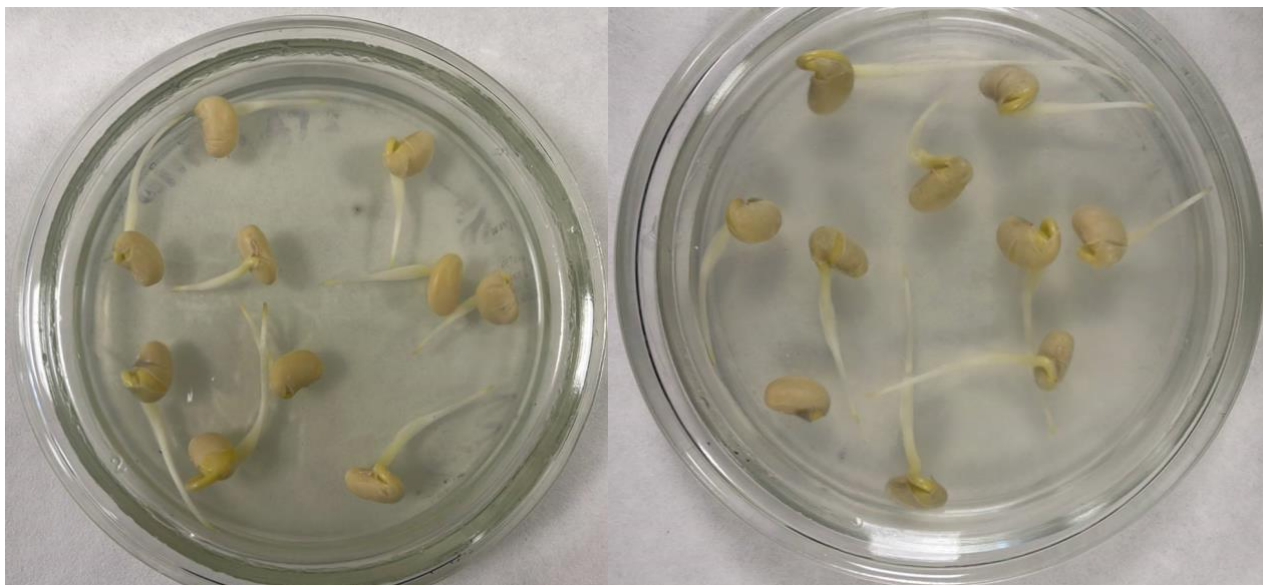


Рис. 3.1. Проростання насінин на 4 добу інкубації. Відсутність видимих ознак бактеріальної та грибної контамінації.

Повторна оцінка була проведена на 7 добу інкубації. На цьому етапі результати кардинально змінилися. У більшості чашок Петрі навколо пророслих насінин з'явилися колонії мікроорганізмів, переважно бактеріальні. В деяких чашках спостерігалася наявність міцелію.

Зовнішній вигляд насіння сої під час пророщування:

На першій чашці спостерігається павутиноподібне густе покриття міцелію, а також вологі колонії з нерівними краями діаметром 4 мм (рис. 3.2.). Міцелій білий, пухкий, з тонкими гіфами. Згідно визначника Index Fungorum, це представник роду *Rhizopus* або *Mucor*, бо для них є характерним такий швидкий ріст.

Навколо самих насінин та на окремих ділянках середовища спостерігається помітні слизові колонії. Вони є блискучими, деякі мають жовтуватий або бежевий колір. Також на насінинах видно бактеріальний наліт. Ймовірними збудниками можуть бути бактерії родів *Pseudomonas* або *Bacillus*, згідно визначника Bergey's.



Рис. 3.2. Інтенсивна контамінація зразків сої змішаною мікрофлорою.

На другій чашці (рис. 3.3.) так само спостерігається біло сірий пухнастий міцелій, що покриває значну частину площі. На деяких насінинах помітні дрібні чорні точки, спорангії, що свідчить про перехід гриба до спороношення.

Характер росту вказує на ймовірний збудник роду *Rhizopus*, згідно визначника Index Fungorum.

Навколо насінин спостерігається помутніння середовища та слизовий наліт. Це свідчить про прояв бактеріозів сої (за морфологічними характеристиками нами віднесено до збудника *Pseudomonas*). Також на деяких корінцях та стеблах видно коричневі плями, що свідчить про некроз тканин спричинений дією росту грибів. А деякі насінини змінили колір на темно коричневий, тобто вони втратили життєздатність під дією змішаної мікрофлори.



Рис. 3.3. Фітопатологічна оцінка насіння сої.

На шостій чашці (рис. 3.4.) спостерігається виключно бактеріальна контамінація. Навколо кожної насінини сформувалися чітко обмежені, слизові колонії. Вони мають прозоро-жовтий колір, вологим виглядом. Така морфологія є характерною для роду *Xanthomonas*, згідно визначника Bergey's. Стан насіння свідчить про те, що бактерії пригнічують проростання.

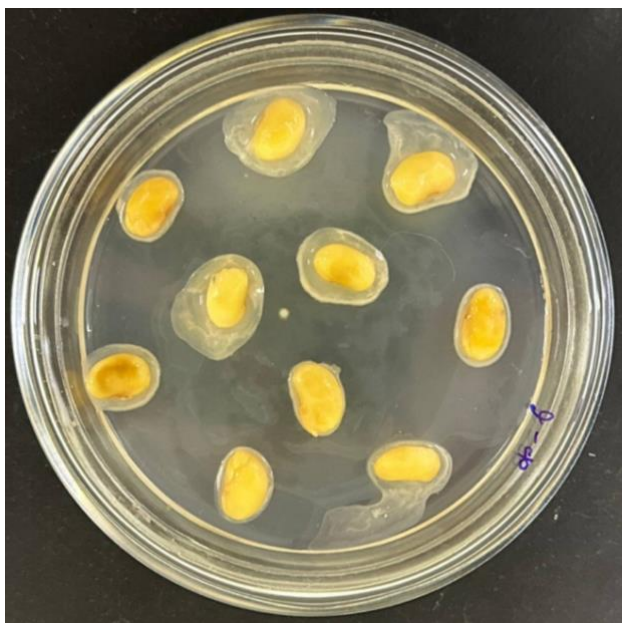


Рис. 3.4. Бактеріальна контамінація насіння сої.

На восьмій чашці (рис. 3.5.) усе насіння проросло. Не зважаючи на присутню мікрофлору, проростки виглядають відносно здоровими. Однак у центральній частині чашки спостерігається точковий прояв міцелію. Міцелій має симетричну колонію та темне сіро-коричнєве забарвлення. Ймовіріше за все збудником є *Diaporthe* spp. або *Fusarium* spp., згідно визначника Index Fungorum.



Рис. 3.5. Проростання насіння сої з виявленням точкової грибної контамінації.

На дев'ятій чашці (рис. 3.6.) прослідковується значна кількість бактеріальних колоній навколо насінин. Вони мають слизову структуру, опуклу форму та напівпрозорий колір. Можливим збудником може бути *Pseudomonas* (згідно визначника Bergey's), бо слизові ореоли навколо насіння є типовим для цього патогену.



Рис. 3.6. Зображення значної кількості бактеріальних колоній.

Також можна побачити одну насінину, що втратила життєздатність, вона покрита щільним зморшкуватим бактеріальним нальотом жовтого кольору. Така складчаста текстура є ознакою бактерій роду *Bacillus*, згідно визначника Bergey's. Візуально помітно, що насінина втратила тургор та розм'якшення тканин.

Оскільки середовище було голодним, ріст колоній відбувався переважно за рахунок поживних речовин, що виділяються самим насінням під час проростання.

Цікавим виявився факт того, що в перші 4 доби ріст сторонньої мікрофлори був відсутнім. А на 7 добу він масово з'явився. Це дає зрозуміти, що переважна частина виявлених мікроорганізмів є внутрішньою, а не поверхневою.

Для подальшої ідентифікації було відібрано та пересіяно колонії з типовими морфологічними ознаками фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*.

При дослідженні культуральних та морфологічних ознак фітопатогенних бактерій роду *Xanthomonas* було встановлено, що на поживному середовищі вони формують круглі колонії діаметром 2-4 мм з рівними краями. Колонії мають характерне жовте забарвленням, щільну консистенцію та рівну блискучу поверхню. За ступенем прозорості ізоляти були прозорими або напівпрозорими. Виділення водорозчинного пігменту в поживне середовище не спостерігалось. За типом забарвлення за Грамом досліджувані культури були віднесені до Грам-негативних бактерій (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Зображення Грам-негативних бактерій роду *Xanthomonas*.

При культивуванні на картопляному агарі досліджувані ізоляти роду *Pseudomonas* формували круглі колонії діаметром 2-4 мм з рівними або слабо хвилястими краями. Колонії характеризувалися білим, світло-сірим або кремовим забарвленням. Мали прозору та напівпрозору структуру. Поверхня була гладка блискуча або дрібнозерниста. Консистенція колоній щільна. Здатність до утворення водорозчинного пігменту в товщу поживного середовища була відсутня. За фарбуванням за Грамом встановлено, що клітини є Грам-негативними (рис. 3.8.).



Рис. 3.8. Зображення Грам-негативних бактерій роду *Pseudomonas*.

В результаті проведеного дослідження і вивчення морфолого-культуральних властивостей нами було виділено ізоляти бактерій, які віднесено до родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*.

Зокрема, для наступних дослідів було відібрано круглі, кремові з рівними краями колонії, характерні для бактерії *Pseudomonas*.

3.2. Особливості калюсогенезу *in vitro*

У рамках дослідження з формування стійкості сої до бактеріальних хвороб з ключових етапів було одержання недиференційованої калюсної тканини *in vitro*.

Первинний калюс індукували з проростків сої на агаризованому середовищі Мурасіге-Скуга. Середовище було доповнене регуляторами росту для стимуляції диференціації тканин.

Насіння висаджували на безгормональне живильне середовище МС. Через 7 діб після посіву спостерігалось 90% схожості насіння без ознак контамінації. В

10% пробірок було виявлено бактеріальну контамінацію, середовище помутніло та з'явилася слизова колонія навколо насінини (рис. 3.9.). Ймовірно, це пов'язано з неповним видаленням ендогенної мікрофлори насіння або мікротрищинами в оболонці. Цей результат підтверджує загальну високу ефективність стерилізації (90%).

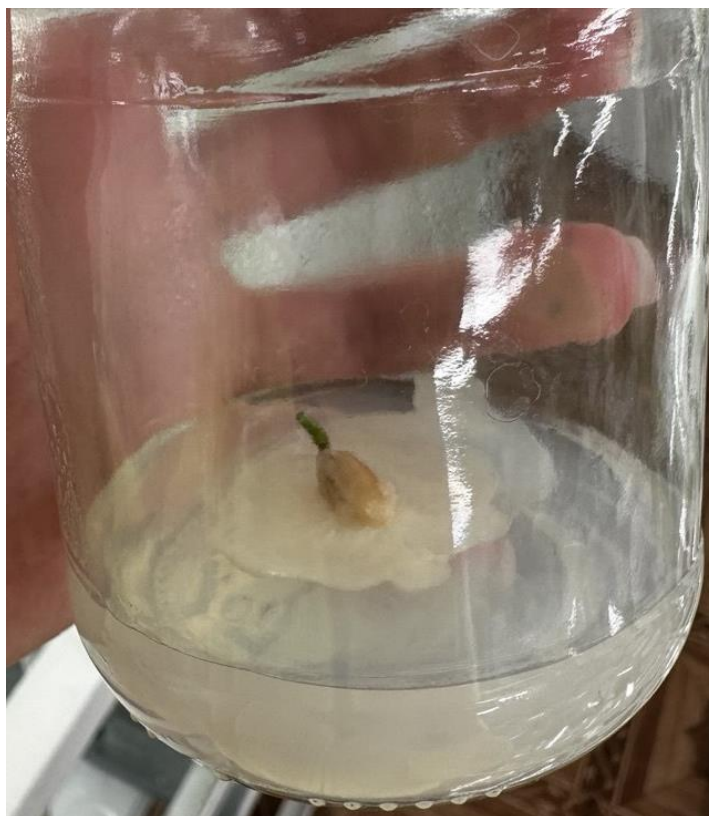


Рис. 3.9. Бактеріальна контамінація культури експлантату на живильному середовищі.

У всіх інших пробірках спостерігалася насінини з маленьким зеленим проростком, що знаходиться на поверхні середовища. Відсутність помутніння середовища та чистота навколо насінини чітко свідчить про успішну стерилізацію більшості зразків (рис. 3.10.).



Рис. 3.10. Стерильні варіанти культури на 7 добу.

Після появи проростків у стерильних пробірках, проводили відділення пагонів.

На 10 добу після перенесення паростків почалося активне формування первинного калюсу. Калюсна тканини мала характерний блідо жовтий колір, була зернистою та крихкою. Спостереження за ростом калюсу показало поступове збільшення його об'єму. Морфологічні особливості калюсу показали його високу проліферативну активність тканин.

Подальше культивування (20 діб) супроводжувалося інтенсивним ростом калюсу та переходом до ранніх стадій органогенезу.

На рис.3.11. зображено розвинену культуру. Видно щільний жовтуватий калюс з вираженими зеленими листковими примордіями та стебловою частиною. Важливою особливістю було збереження стерильності в більшості повторностей. Після перенесення паростків контамінації не були зафіксовані.



Рис. 3.11. Формування інтенсивно ростучого пагону на базі первинного калюсу в умовах асептичної культури.

Детальніше можна розглянути на рис.3.12.. У чашці Петрі спостерігається відокремлений пагін з 3 зеленими листками, прикріплений до білувато зеленого вузла та жовтого калюсу. Розмір калюсної маси становить близько 1,5-2,0 см, структура зерниста.



Рис. 3.12. Детальніший огляд калюсної маси та розвиненого пагону.

Загалом особливість калюсогенезу у цьому досліді характеризувалася високою частотою індукції (90%), формуванням пухкої тканини жовтуватого кольору і швидким переходом до органогенезу. Висока ефективність калюсогенезу, свідчила про чутливість експлантів до складу поживного середовища. Використання середовища Мурасіге-Скуга, доповненого ауксином 2,4-D та цитокініном БАП, забезпечило високу частоту калюсоутворення. Ауксин 2,4-D у низькій концентрації стимулював інтенсивну наростання калюсної біомаси при збереженні її недиференційованого стану. А БАП підтримував подальший розвиток тканин і сприяв до раннього органогенезу. Без додавання цих фітогормонів калюсогенез був би дуже слабким і повільним.

Одиничний випадок з контамінацією суттєво не вплинув на загальні результати. Однак цей інцидент дав зрозуміти важливість ретельної стерилізації насіння, яке містить ендогенну мікрофлору.

У підсумку, ефективність калюсогенезу *in vitro* у проведеному досліді склала 90%. З 10 початкових насінин отримали 9 життєздатних калюсних ліній.

3.3. Оцінка стійкості клітинних ліній до бактеріальних патогенів

Першим етапом дослідження було створення з попередньо отриманого первинного калюсу (рис. 3.13.) сої у суспензійну культуру. Це було необхідно для створення гомогенного середовища і рівномірного розподілу рослинних клітин у поживному субстраті. Даний етап є важливим для подальшої оцінки їхньої взаємодії з фітопатогенами.

Для створення суспензії було відібрано калюс розміром 5-10 мм. Відібраний матеріал ретельно розтерли стерильним шпателем. Отриману біомасу перенесли у колбу з рідким середовищем Мурасіге-Скуга. Суспензію інкубували на орбітальному шейкері протягом 5-7 діб за стандартних умов (25 ± 1 °C, 16/8-годинний фотоперіод). Після інкубації проводили фільтрацію суспензії через стерильну марлю для видалення великих часток і отримання однорідної дрібноклітинної суспензії. Результатом цього етапу стало успішне створення клітинної суспензії.



Рис. 3.13. Отриманий первинний калюс.

Отриману клітинну суспензію змішували з розігрітим твердим живильним середовищем на основі MS, ретельно перемішували та розливали по чашках Петрі. Після застигання середовища проводили селекцію на стійкість до бактеріального патогена шляхом внесення прогрітих клітин *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* у різних концентраціях.

Результати оцінки впливу різних концентрацій прогрітих клітин бактерій на виживання калусних ліній наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Вживання калусних ліній при різних концентраціях прогрітих клітин *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* у живильному середовищі

Прогріті клітини бактерій	Колонії
0,4%	100%
0,8%	73%
2,0%	64%
4,0%	38%
6,0%	24%
10%	1-3%

Нами було відібрано калюсні лінії, які показали стійкість до фітопатогена на рівні 38% за додавання в середовище 4% прогрітих клітин бактерій. В подальшому для одержання рослин-регенерантів використовували дані клітинні лінії.

Відібрані стійкі калюсні лінії переносили на середовище для індукції органогенезу, що містило MS-середовище з регуляторами росту рослин та 4 % прогрітих клітин *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. В результаті відбору *in vitro* одержано рослини-регенеранти, які характеризувалися підвищеною стійкістю до бактеріального патогена *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

3.4. Ефективність впливу фунгіцидів на збудників бактеріальних хвороб сої

Для захисту рослин сої від фітопатогенних бактерій було проведено оцінку ступеня чутливості збудника *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* до хімічних, біологічних препаратів та антибіотиків.

Дію препаратів на збудника бактеріальної хвороби сої вивчали методом дифузії в агар. У центрі чашок Петрі пробковим свердлом робили лунки, куди стерильними наконечниками вносили випробовувані препарати в рекомендованих виробником концентраціях (1:1, 1:2, 1:4) та їх розчинах. Радіально підсівали однодобову суспензію бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* з титром 10^9 КУО/мл. Чашки інкубували 48 годин у термостаті при 28 ± 1 °C. Чутливість до антибіотиків оцінювали класичним методом паперових дисків. Ступінь антибактеріальної активності визначали за діаметром зон інгібування росту тест-культури: >40 мм – високоактивний препарат, 15-40 мм – середньоактивний, 10-15 мм – слабоактивний.

Результати впливу хімічних препаратів на ріст фітопатогенної бактерії наведено в таблиці 3.3. і рис. 3.14.

Серед хімічних препаратів найбільшу антибактеріальну активність продемонстрували мідь-вмісні засоби Медян та Артемікс. Навіть при чотириразовому розведенні (1:4) вони зберігали стабільні зони інгібування 25-

26 мм, що свідчить про високу стійкість препаратів до розведення та перспективність їх застосування проти Cu-толерантних штамів *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Препарат Амістар проявив значно нижчу ефективність, особливо при зниженні концентрації.

Таблиця 3.3.

Ефективність дії хімічних препаратів на ріст
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*

Препарат	Діаметр зон інгібування			
	контроль	1:1	1:2	1:4
Амістар	-	20 мм	12 мм	9 мм
Медян	-	35 мм	28 мм	26 мм
Артемікс	-	33 мм	29 мм	25 мм

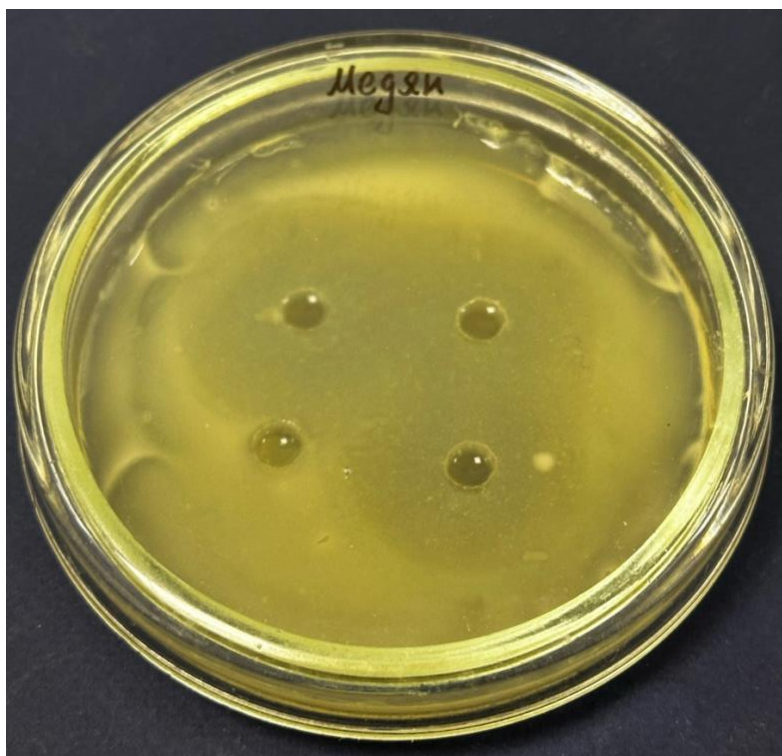


Рис. 3.14. Результати дослідження антибактеріальної активності хімічного препарату «Медян» .

Результати дії біологічних препаратів на ріст *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* представлено в таблиці 3.4. та рис. 3.15.

Таблиця 3.4.

Ефективність дії біологічних препаратів на ріст
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*

Препарат	Діаметр зон інгібування			
	контроль	1:1	1:2	1:4
Фітохелп	-	40 мм	30 мм	25мм
Фітоцид	-	28 мм	12 мм	10 мм
Казумін	-	40 мм	34 мм	28 мм



Рис. 3.15. Результати дослідження антибактеріальної активності біологічного препарату «Фітохелп».

Серед біологічних препаратів найвищу ефективність показав Казумін (середнє 34,0 мм), який у чистому вигляді створював зони інгібування понад 40 мм і зберігав високу активність навіть при розведенні. Також задовільні

результати продемонстрував Фітохелп. Препарат Фітоцид виявився менш стабільним при зниженні концентрації.

Результати щодо чутливості *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* до антибіотиків наведено в таблиці 3.5. та рис. 3.16.

Таблиця 3.5.

Ефективність дії антибіотиків на ріст *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Антибіотик	Діаметр зон інгібування
Антибіотик Контроль	-
Стрептоміцин	35 мм
Пеніцилін	-
Тетрациклін	28 мм



Рис. 3.16. Результати дослідження антибактеріальної активності антибіотиків.

Найвищу бактерицидну активність серед антибіотиків продемонстрував стрептоміцин (35 мм). Тетрациклін показав середню активність, тоді як пеніцилін не проявив жодної дії.

Порівняльний аналіз усіх груп препаратів показав, що загальні середні значення діаметрів зон інгібування становили: 24,1 мм – для хімічних препаратів, 27,4 мм – для біологічних препаратів та 21,0 мм – для антибіотиків. Найефективнішими в виявилися стрептоміцин, Казумін, Медян та Артемікс.

Отриманні результати дозволили зробити висновок, що антибіотик стрептоміцин та препарат Медян виявилися найбільш перспективними для обмеження розвитку бактеріальних хвороб сої. Біопрепарати (Фітохелп, Казумін) також показали гарні результати і можуть бути використані в інтегрованих системах захисту.

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження підтвердило ефективність застосування сучасних біотехнологічних підходів для одержання рослин сої (*Glycine max* (L.) Merr.) з підвищеною стійкістю до бактеріальних хвороб. Під час виконання експериментів вдалося підібрати оптимальні умови одержання калюсної культури і суспензійної культури *Glycine max* (L.) Merr. Проведено оцінку стійкості отриманих клітинних ліній до фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

1. У результаті проведеного дослідження виділено ізоляти, які за морфологічними та культуральними ознаками були віднесені до родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*.

2. Встановлено, що живильне середовища Мурасіге-Скуга, доповнене 2,4-Д в концентрації в 0,2 мг/л є оптимальним для індукції пухкого калюсу сої, частота калюсогенезу складала 90%. Одержаний калюс був блідо-жовтого кольору, зернистий, швидко наростає і вже на двадцятую добу переходив до раннього органогенезу.

3. Встановлено напівлетальну концентрацію 4% прогрітих клітин *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* для відбору калюсних ліній сої з підвищеною стійкістю до фітопатогена, частка життєздатних колоній становила 38%. Отримати рослини-регенеранти сої, які характеризувалися підвищеною стійкістю до *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

4. Виявлено антибактеріальну активність хімічних препаратів Медян та Артемікс, біологічних препаратів Казумін, Фітохелп, антибіотиків стрептоміцин для обмеження розвитку *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Canadian Food Inspection Agency (CFIA). The Biology of Glycine max (L.) Merr. (Soybean). Biology Document BIO2021-01. Ottawa: CFIA, 2021. URL: <https://inspection.canada.ca/en/plant-varieties/plants-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/glycine-max-merr>.
2. Missouri Botanical Garden. (n.d.). Glycine max — Plant Finder. Missouri Botanical Garden. URL: <https://www.missouribotanicalgarden.org/plantfinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=280548>.
3. USDA Foreign Agricultural Service. (2025). Soybeans: Production. Foreign Agricultural Service, U.S. Department of Agriculture. URL: <https://www.fas.usda.gov/data/production/2222000>.
4. USDA Foreign Agricultural Service. (n.d.). Production Data. Foreign Agricultural Service, U.S. Department of Agriculture. URL: <https://www.fas.usda.gov/data/production/up>.
5. Vargas-Almendra A., Escamilla D. M., et al. Advances in Soybean Genetic Improvement: From Conventional Breeding to New Breeding Technologies. *Plants*. 2024;13(21):3073. URL: <https://doi.org/10.3390/plants13213073>.
6. Revista Cultivar. (n.d.). Bacterial pustule on soybeans caused by *Xanthomonas axonopodis*. Revista Cultivar. URL: <https://revistacultivar.com/articles/bacterial-pustule-on-soybeans-caused-by-xanthomonas-axonopodis>.
7. Malvick, D. (2018). Bacterial pustule on soybean. University of Minnesota Extension. URL: <https://extension.umn.edu/soybean-pest-management/bacterial-pustule-soybean>.
8. Ohio State University. (n.d.). Bacterial blight of soybean (extended version). OSU Soybean Disease. URL: <https://u.osu.edu/osusoybeandisease/foliar-diseases/bacterial-blight/extended-version/>.

9. Bayer Crop Science. (n.d.). Bacterial blight in soybean. Cropscience.bayer.us.

URL: <https://www.cropscience.bayer.us/articles/bayer/bacterial-blight-in-soybean>.

10. Lang, J. M., et al. (2025). Bacterial blight of soybean caused by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Plant Pathology, Early view. URL: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.70000>.

11. Osdaghi, E., Young, A. J., & Harveson, R. M. (2020). Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. Molecular Plant Pathology, 21(5), 605–621. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7170776/>.

12. Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., & Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. Physiology and Molecular Biology of Plants, 28(2), 485–504. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8943088/>.

13. Wang, J., Ni, H., Chen, L., Zou, J., Liu, C., Chen, Q., Ratet, P., & Xin, D. (2022). Effector-dependent and -independent molecular mechanisms of soybean–microbe interaction. International Journal of Molecular Sciences, 23(22), 14184. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/22/14184>.

14. Sandhu, D., Tasma, I. M., Frasch, R., & Bhattacharyya, M. K. (2009). Systemic acquired resistance in soybean is regulated by two proteins, Orthologous to Arabidopsis NPR1. BMC Plant Biology, 9, 105. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2738679/>.

15. Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. Nature, 444(7117), 323–329. URL: <https://www.nature.com/articles/nature05286>.

16. Zhang, Y., Wang, Y., & Yang, X. (2022). Action mechanisms of effectors in plant-pathogen interaction. International Journal of Molecular Sciences, 23(12), 6758. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9224169/>.

17. Buzdar, M. I., Awan, M. J. A., Raza, G., Naqvi, R. Z., Mansoor, S., & Amin, I. (2025). Potential of conventional and new breeding technologies to manage

soybean diseases. *Phytopathology Research*, 7(1), 49. URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/s42483-025-00338-0>.

18. Lin, F., Chhapekar, S. S., Vieira, C. C., Da Silva, M. P., Rojas, A., Lee, D., Liu, N., Pardo, E. M., Lee, Y.-C., Dong, Z., Pinheiro, J. B., Ploper, L. D., Rupe, J., Chen, P., Wang, D., & Nguyen, H. T. (2022). Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(11), 3773–3872. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9729162/>.

19. El Hadrami, A., El Idrissi-Tourane, A., El Hassni, M., Daayf, F., & El Hadrami, I. (2005). Toxin-based in-vitro selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud Fusarium wilt. *Comptes Rendus Biologies*, 328(8), 732–744. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125651/>.

20. Collard, B. C. Y., & Mackill, D. J. (2007). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), 557–572. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2610170/>.

21. Tyagi, S., Kumar, R., Kumar, V., Won, S. Y., & Shukla, P. (2020). Engineering disease resistant plants through CRISPR-Cas9 technology. *GM Crops & Food*, 12(1), 125–144. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7583490/>.

22. Borrelli, V. M. G., et al. (2018). The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1245. URL: https://aau.ac.in/NAHEP/lectures/Lecture_5/Borrelli%20et%20al.%202018.pdf

23. Masangano, M., Birhanie, Z. M., Miao, L., Wu, L., Gao, H., Wei, P., Dong, B., Koros, D. K., Soltani, M. Y., Mahamadou, A. M., Yang, Y., Li, J., & Xiaobo, W. (2025). Impact of light quality on accelerating soybean speed breeding efficiency using LED-based systems. *Plant Growth Regulation*. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s44372-025-00347-5>.

24. Yu, S.-F., Wang, C.-L., Hu, Y.-F., Wen, Y.-C., & Sun, Z.-B. (2022). Biocontrol of three severe diseases in soybean. *Agriculture*, 12(9), 1391. URL: <https://www.mdpi.com/2077-0472/12/9/1391>.

25. Ayaz, M., Li, C.-H., Ali, Q., et al. (2023). Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: Journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives. *Molecules*, 28(18), 6735. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10537577/>.
26. Kakembo, D., & Lee, Y. H. (2019). Analysis of traits for biocontrol performance of *Pseudomonas parafulva* JBCS1880 against bacterial pustule in soybean plants. *Biological Control*, 134, 72–81. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104996441930146X>.
27. Lee, J., Kim, S., Jung, H., Koo, B.-K., Han, A. J., & Lee, H.-S. (2023). Exploiting bacterial genera as biocontrol agents: mechanisms, interactions and applications in sustainable agriculture. *Journal of Plant Biology*, 66(6), 485–498. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12374-023-09404-6>.
28. Meena, M., Yadav, G., Sonigra, P., Nagda, A., Mehta, T., Swapnil, P., Harish, & Marwal, A. (2022). Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress. *Plant Stress*, 5, 100048. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667064X22000483>.
29. Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, 11(3), 386. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/3/386>.
30. Zehra, A., Raytekar, N. A., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100054. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8610294/>.
31. Begum N., Elina A. et al. In vitro Micro Propagation of Soybean (*Glycine max*) BARI-5 Variety // *The Open Microbiology Journal*. – 2019. - Vol.13.-P.177-187. URL: <https://doi.org/10.2174/1874285801913010177>.
32. Buzdar M. I. et al. Potential of conventional and new breeding technologies to manage soybean diseases // *Phytopathology Research*. - 2025. – Vol.7. – Article 49. URL: <https://doi.org/10.1186/s42483-025-00338-0>.

33. Escamilla D. et al. Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments // *Food Science & Nutrition*. – 2019. – Vol. 7. – P. 3194-3205. URL: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1166>.
34. Gebremedhn H. M. et al. Advanced biotechnology techniques for disease resistance in soybean // *SN Applied Sciences*. – 2024. – Vol. 6. – Article 06204-6. URL: <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06204-6>.
35. Muresan, L., Clapa, D., Rusu, T., Wang, T. T. Y., & Park, J. B. (2021). Soybean callus-A potential source of tocopherols. *Plants*, 10(12), 2571. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8703269/>.
36. International Institute for Sustainable Development (IISD). Global Market Report: Soybean 2024. -2024. – 48 p. URL: <https://www.iisd.org/system/files/2024-02/2024-global-market-report-soybean.pdf>.
37. Joyner E. Y. et al. Callus Induction and Organogenesis in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. Pyramid // *The Open Plant Science Journal*. – 2010. – Vol. 4. – P.18-21. URL: <https://benthamopen.com/contents/pdf/TOPSJ/TOPSJ-4-18.pdf>.
38. Mishra N. et. Al. Cell Suspension Culture and In Vitro Screening for Drought Tolerance in Soybean Using Poly-Ethylene Glycol // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – Iss.3.- Article 517. URL: <https://doi.org/10.3390/plants10030517>.
39. Wu P. H. et al. Colonization compatibility with *Bacillus altitudinis* confers soybean seed rot resistance // *The ISME Journal*. – 2024. – Vol. 18. – Iss.1. – wrae142. URL: <https://academic.oup.com/ismej/article/18/1/wrae142/7723476>.
40. Інститут сільського господарства Степу НААН. Сорт сої Золушка. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://isgs-naan.com.ua/zolushka>.
41. Міністерство охорони здоров'я України. Наказ №167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»». – URL: https://infectioncontrol.org.ua/wp-content/docs/Nakaz_%20167_05.04.2007.pdf.
42. AgroElita. Бактеріальні хвороби сої. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://agroelita.info/bakterialni-hvoroby-soji/>.

43. SuperAgronom. Сорт сої Золушка НААН України. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://superagronom.com/nasinnya-zernobobovisoya/zolushka-naan-ukrayini-id12168>.

44. Fan Q. et al. Antibacterial effect of cooper composites against *Xanthomonas euvesicatoria* // Crop Protection. – 2021. – Vol.139. – 105366. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105366>.

45. Index Fungorum. (n.d.). Index Fungorum: the global fungal name database. URL: <https://www.indexfungorum.org/>.