

## РЕФЕРАТ РОБОТИ

### **«Формування адаптивного потенціалу рослинно-мікробних взаємодій як основа ризосферних та екосистемних процесів»,** виконаної колективом авторів у складі:

завідувача лабораторії, к.с.-г.н. Олійник Ольги Олександровни,  
старшого наукового співробітника, к.с.-г.н. Борко Юлії Петрівни,  
старшого наукового співробітника, к.с.-г.н. Цехмістер Ганни Вікторівни,  
начальника відділу, здобувача Субіна Олександра Володимировича

**Актуальність теми.** Зростання рівня та значення продовольчого виробництва, безпечності та якості готової рослинної продукції у сучасних умовах потребує розробки нових екологічно обґрунтованих і природно-збалансованих агрозаходів, що спрямовані на підвищення продуктивності сільськогосподарських культур, у першу чергу, за рахунок функціонально значущого потенціалу рослинно-мікробних взаємодій із максимальним розкриттям адаптивних можливостей самих рослин. Одним із таких сучасних напрямів є індукція стимулювання стійкості рослин за участю мікробних сигнальних екзо-, ендогенних речовин (індукторів або еліситорів), які запускають захисні реакції, зокрема проти біотичних та антропогенних стресових чинників ґрунтового середовища. Також бурхливого розвитку набув напрям екологічного землеробства, однією із складових якого є використання біологічних препаратів на основі ґрутових корисних мікроорганізмів або речовин біологічного походження. За сучасних умов ведення аграрного виробництва, робота, виконана колективом авторів, дозволяє запропонувати нові ефективні шляхи підвищення продуктивності сільськогосподарських культур за рахунок адаптивного потенціалу рослинно-мікробних взаємодій у агроценозах на фоні збереження екологічної складової ґрунтів.

Зважаючи на вищесказане, метою роботи було розкриття особливостей формування рослинно-мікробного адаптивного потенціалу агрофітоценозів у системі ризосфери з метою підвищення продуктивності і стійкості сільськогосподарських рослин до біотичних, антропогенних чинників.

Відповідно до поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. оцінити особливості формування мікробних комплексів у ризосфері рослин на рівні різних фізіологічних і функціонально-значущих груп під впливом кореневих ексудатів на прикладі *Beta Vulgaris* (протягом онтогенезу);
2. дослідити структуру, різноманіття, таксономічного складу метагеному прокаріотів ґрунту класичними і молекулярно-біологічними (піросеквенування) методами;
3. визначити загальну біологічну активність мікроорганізмів ризосфери рослин за вмістом активної біомаси, емісією CO<sub>2</sub> з ґрунту, інтенсивністю продукування ферментів та оцінити спрямованість мікробіологічних процесів трансформації органічних речовин ґрунту;
4. провести порівняльний аналіз видового складу мікобіоти філоплани, ризоплани та ризосфери рослин при обробці розчинами хітозанів на прикладі *Fragaria ananassa* Duch;
5. встановити якісний склад, визначити динаміку акумуляції фенольних сполук та специфіку реакцій рослин за дії розчинів хітозанів різного біологічного походження;
6. проаналізувати вплив саліцилової кислоти на морфометричні показники, метаболоміку та антиоксидантний потенціал *Fragaria ananassa* Duch в умовах *in vitro*;
7. дослідити вплив анатомічної пластичності сортів на регенераційний потенціал пагонів рослин на прикладі *Rosa damascena* Mill. у культурі *in vitro* та встановити вплив складу живильного середовища на морфогенез та антиоксидантний потенціал модельних культур в умовах *in vitro*;
8. побудувати циклічні моделі мікроклонального розмноження рослин для оптимізації біотехнологічного процесу;
9. виявити особливості приживлюваності рослин-регенерантів на етапі адаптації до умов відкритого ґрунту;
10. ідентифікувати *Acremonium sp.* 502, визначити його гістотропну локалізацію у коренях та дослідити сортову чутливість рослин на прикладі *Cucumis sativus* L.;
11. дослідити фіто-, цито- та генотоксичність культуральної рідини *A. cucurbitacearum* 502;

12. провести скринінг мікроорганізмів-антагоністів гриба *A. Cucurbitacearum* 502, відібрати найбільш перспективний штам та визначити біологічну ефективність відіраного мікроорганізму за передпосівної обробки насіння.

Представлена робота ґрунтуються на започаткованих в Україні положеннях, вченнях та продовжує розвиток наукових поглядів шкіл В. Вернадського, С. Виноградського та інших, і полягає в унікальному комплексному поєднанні різносторонніх сучасних світових рівнів, напрямів та методів дослідження щодо розкриття механізмів ефективних адаптивних взаємодій рослин з мікроорганізмами у ризосфері.

Авторами досліджено функціональну складову мікробних комплексів ризосфери рослин на прикладі *Beta Vulgaris*, які використовують у своєму метаболізмі прості вуглець-вмісні сполуки (мономери), що входять до складу кореневих ексудатів рослин. Оцінено особливості формування структури мікробіому ризосфери, який трансформує органічні сполуки ґрунту у доступні для рослин форми, у тому числі під впливом кореневих ексудатів. На світовому рівні з використанням новітнього ультрасучасного методу піросеквенування геному визначено біорізноманіття, таксономічну структуру та екологічні характеристики еубактеріального комплексу ризосфери рослин, аналогів якому немає в Україні. Досліджено біологічну активність і спрямованість мікробіологічних процесів в агроценозі культури протягом її онтогенезу. Встановлено, що у ризосфері рослин на прикладі *Beta Vulgaris*, формується специфічний для даної культури мікробоценоз з диференційованою чисельністю мікроорганізмів (що різиться в межах 4,2 разів), які беруть участь у перетворенні органічних сполук, в т.ч. і в доступні для рослин форми. Протягом онтогенезу відбувається перерозподіл функціональної активності біологічної складової ґрунту, структури мікробної біомаси (87,5–89,7 %, якої становили бактерії, решта - мікроміцети), зміна інтенсивності емісії  $\text{CO}_2$ , (50,8–97,4 мг С– $\text{CO}_2$ /кг\*добу), активності інвертази (17,6–20,2 мг глюкози/г ґрунту за добу), пероксидази та поліфенолоксидази (0,99–1,08 та 1,32–1,59 мг пурпургаліну/г ґрунту), стійкості мікробного комплексу ( $Q_R = 0,27$ -0,32), що, у свою чергу, сприяє зміні направленості мікробних метаболічних процесів трансформації органічних сполук ( $K_{\text{м.т.р.}} = 14,7$ -56,5) і визначає напрям мікробно-рослинних взаємодій. Визначено відсутність конкуренції за

доступний азот між мікроорганізмами та рослинами, забезпеченість їх у достатній мірі легкозасвоюваними поживними речовинами у зв'язку з переважанням процесів синтезу органічної речовини над її деструкцією. Це свідчить про екологічну збалансованість агроценозу і сприяє формуванню гомеостатичних мікробно-рослинних комплексів та закономірній стадії сукцесії із відповідною функціональною активністю мікроорганізмів.

У роботі встановлено особливості синтезу, якісного та кількісного складу вторинних метаболітів фенольної природи під дією еліситорів у рослинах на прикладі *Fragaria ananassa* Duch. Досліджено вплив саліцилової кислоти на морфометричні процеси рослин у культурі *in vitro*. Встановлено відмінності відповідних реакцій рослин *Fragaria ananassa* Duch на обробку низько- і високомолекулярним хітозаном. Досліджено динаміку фенольних сполук під дією хітозанів рослинного і тваринного походження. Показано особливості накопичення елагової кислоти, як одного із основних прекурсорів синтезу захисних фенольних сполук, зокрема гідролізованих танінів. Виявлені добові коливання показників вмісту фенольних сполук, зокрема елаготанінів і флавоноїдів у листках модельних культур. Визначено видовий склад, рівень заселення і частоту трапляння мікроміцетів філоплани, ризоплани та ризосфери рослин. Доведено, що за обробки низькомолекулярним хітозаном видовий склад філоплани *Fragaria ananassa* Duch суттєво відрізняється від контрольної групи рослин (коєфіцієнт спільноти Стугрена-Радулеску  $\rho=1,0$ ). Підтверджено, що міцелій переважної більшості грибів є малочутливим до обробки листків розчинами хітозану та його похідних, тому застосування біополімеру для захисту рослин доцільно проводити у період інтенсивного спороношення фітопатогенів, який є значно чутливішим до їхнього впливу. Показано особливості біоцидної дії біологічно-активних композицій хітозану на фітопатогени на шляху до адаптації та реалізації системи захисту рослин від фітопатогенів.

Колективом авторів успішно поєднано стерильну культуру рослин з безперервним отриманням садивного матеріалу та вивченням біопрепаратів при висадці у ґрутові умови. Підібрано оптимальну композицію субстратної суміші для адаптації рослин-регенерантів на прикладі сортів *Rosa damascena* Mill. до умов закритого ґрунту. Показано специфіку відповідних реакцій

модельних культур на стресові фактори та можливість контролю відносно цих даних. Оптимізовано технологічні заходи ступінчастої адаптації сортів *Rosa damascena* Mill. на твердих субстратах (2 : 1 торф-перліт) в умовах *ex situ*, що дозволяє отримувати контейнерні культури з ефективністю адаптації 92 %.

Автори показали, що фітопатогенний для рослин *Cucumis sativus* L. гриб *A. Cucurbitacearum* 502 здатний проникати у тканини кореня рослин, утворюючи внутрішньоклітинний міцелій. Рослини *Cucumis sativus* L. різних сортів різняться по чутливості щодо гриба. Досліджено вплив культуральної рідини *A. Cucurbitacearum* 502 на рослинні тест-системи. Проведено скринінг мікроорганізмів-антагоністів цього фітопатогена. Запропоновано штам *T. viride* 017, який характеризується найшвидшим ростом і активним гіперпаразитизмом.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Наукова значимість отриманих результатів полягає в унікальному комплексному поєднанні різносторонніх напрямків і методів досліджень ефективних взаємодій рослин з мікроорганізмами у ризосфері та екосистемі загалом.

Вперше оцінено ґрутовий мікробіом агрофітоценозів, його функціональну активність, визначено рівень і структуру метагеному, а також адаптивні взаємодії між рослинами і мікроорганізмами у ризосфері.

Колективом авторів успішно проведено досліди, які показують взаємодії в стерильних культурах рослин з отриманням садивного матеріалу та мікроорганізмів і їх препаративних форм. Показано фізіологічні особливості та специфіку відповідних реакцій модельних культур на стресові фактори та можливість контролю формування ризосфери рослин відносно комплексу чинників.

Селекціоновано новий високоефективний штам гриба *T. viride* 017, який характеризується швидкою колонізацією субстрату та гіперпаразитизмом і вперше в Україні і світі запропоновано обробку насіння *Cucumis sativus* L. сусpenзією спор *T. viride* 017 для захисту рослин від *A. cucurbitacearum* - збудника акремоніозу - відносно нової та маловивченої хвороби.

Поглиблено уявлення щодо впливу кореневих ексудатів рослин на функціональну структуру та активність мікробного комплексу ґрунту, інтенсивність і спрямованість процесів мікробної трансформації органічних

сполук у ризосфері; про відповідні реакції та еліситор-індукований системний імунітет рослин, що є основою при створенні нових екологічно-безпечних агробіологічних засобів для вирощування органічної сільськогосподарської продукції.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати комплексного вивчення адаптивного потенціалу рослинно-мікробних взаємодій дали змогу науково обґрунтувати доцільність поєднання біотехнологічних прийомів отримання оздоровлених рослин-регенерантів та біологічних методів захисту рослин з урахуванням функціональної структури метагеному прокаріотів, зокрема автори показали вплив хітозану та його біологічно активних композицій, речовин фенольної природи та мікробних препаратів на морфогенез та антиоксидантний потенціал рослин. Запропоновано біотехнологічний процес отримання посадкового матеріалу і досліджено морфогенетичний потенціал тканин і органів *in vitro* перспективних для вирощування високопродуктивних сортів рослин на прикладі *Rosa damascena* Mill. Отримані науково-практичні результати досліджень впроваджено у навчальний процес та видано 2 науково-методичні рекомендації.

Запропоновано новий штам *A. Cucurbitacearum* 502, який може бути використаний для створення штучного фону, що дозволить селекціонувати нові, стійкі до акремоніозу сорти рослин *Cucumis sativus* L. Сільськогосподарському виробництву запропоновано новий штам гриба *T. viride* 017 для захисту рослин від збудників кореневих хвороб.

Отримані дані дали змогу розкрити механізми рослинно-мікробної взаємодії і узагальнити висновки щодо їх формування, обґрунтувати практичні пропозиції щодо формування ефективних адаптивних взаємодій у системі рослина-мікроорганізми з метою збереження гомеостазу агроекосистем.

Результати досліджень мають важливе практичне значення щодо широкого спектру об'єктів для оцінки та оптимізації нових екологічно обґрунтованих агрозаходів, адже вони лежать в основі розкриття біологічного потенціалу підвищення продуктивності сільськогосподарських культур, а також розробки стратегій ведення будь якого, у т.ч. високорентабельного сільськогосподарського виробництва.

Головні наукові результати роботи викладені у наступних **висновках:**

1. Протягом онтогенезу рослин, на прикладі *Beta Vulgaris*, за рахунок інтенсивності продукування рослинами кореневих ексудатів, підвищувалась трофічна активність мікробіоти, що супроводжувалось зростанням чисельності мікроорганізмів більшості фізіологічних та функціонально-значимих груп у 1,8-4,2 раза і свідчить про підтримання екологічно-трофічних зв'язків у ризосфері.

2. Різноманіття бактерій у ризосфері буловищим у середньому на 31,7 % порівняно з мікроміцетами та характеризувалося більш рівномірним розподілом та невисоким ступенем домінування. Застосування методу піросеквенування дало змогу виявити високий рівень мікробного різноманіття ( $I_{sh} = 5,36$ ) та більшою мірою його дослідити. Ідентифіковано 214 таксономічних одиниць, серед яких 10,1 % – форми, що не культивуються на поживних середовищах, 23,3 % - не відомі наукі, і саме вони є функціонально значущими у ризосфері. Найбільш чисельними на рівні родин були *Alcaligenaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Gaiellaceae*, *Nitrososphaeraceae*; на рівні роду - *Achromobacter* і *Pseudomonas*, що узгоджується із результатами методів класичної мікробіології.

3. Протягом онтогенезу *Beta Vulgaris* у результаті інтенсифікації коренової ексудації, а також вуглеводного обміну між рослинами та мікроорганізмами відбувалося зростання вмісту активної мікробної біомаси (до 19,3 %), емісії  $\text{CO}_2$  за рахунок мікробного дихання ґрунту (до 91,8 %), рівня мікробного продукування інвертази, пероксидази і поліфенолоксидази (на 8,0-20,4 %), що обумовлювало інтенсифікацію метаболічних процесів трансформації органічних сполук (у т.ч. рослинних решток) ґрунтовою мікробіотою.

4. Встановлено, що у ризосфері *Beta Vulgaris* процеси синтезу органічної речовини переважали над деструкцією ( $K_{Гум.} = 1,33-1,48$ ,  $K_{М.-І.} = 0,93-0,95$ ), що зумовлено накопиченням органічних сполук у ґрунті ( $K_o = 0,24-0,34$ ) та підвищенням забезпеченості рослин і мікроорганізмів легкозасвоюваними поживними речовинами ( $K_p = 0,77-0,83$ ) та свідчить про екологічну збалансованість агроценозу. Інтенсивність мікробної трансформації органічної речовини, темпів синтезу та накопичення гумусових сполук у ґрунті підвищувалась протягом онтогенезу культури.

5. Мікобіота філоплани, ризоплани і ризосфери *Fragaria ananassa* по різному реагує на розчини хітозану, про що свідчить динаміка їхнього видового складу (8-13 видів), зміни рівня заселення (для низькомолекулярного хітозану (НМХ) - 11,1-50,0 %, для високомолекулярного (ВМХ) - 12,5-37,5 %) та частоти трапляння видів (7,7-92,3 % - у філоплані, 14,3-85,7 % - у ризоплані та ризосфері). Підтверджено, що міцелій переважної більшості грибів є малоочутливим до розчинів хітозану та його похідних, тому застосування біополімеру для захисту рослин доцільно проводити у період інтенсивного спороношення фітопатогенів, які є значно чутливішими до його впливу.

6. У рослин *Fragaria ananassa* показані істотні відмінності дії хітозану грибного і тваринного походження на фенілпропаноїдний синтез. З'ясовано, що НМХ індукує збільшення вмісту фенолів і підвищення антиоксидантного потенціалу тканин листків у 1,9 і 3,2 рази відповідно, що свідчить про мобілізацію протекторних систем рослинного організму в умовах розвитку окиснювального стресу. На відміну від НМХ, розчин ВМХ викликає у листках зниження вмісту вільних і слабкозв'язаних з клітинними стінками фенольних сполук, зокрема катехінів та проантоціанідинів майже у 2 рази по відношенню до контролю, що дозволяє зробити припущення про зовсім іншу стратегію запуску власних захисних реакцій рослин проти фітопатогенів.

7. Виявлені добові коливання показників вмісту фенольних сполук, зокрема елаготанінів і флавоноїдів у листках *Fragaria ananassa*. Найбільш вираженим було збільшення вмісту в листках ГГДФ-глюкози (0,6-0,95 мг/мл), галоїлхінної кислоти (0,03-0,07 мг/мл), пентозиду елагової кислоти (0,23-0,37 мг/мл), глікозиду кемпферола (0,23-0,37 мг/мл) та елагової кислоти (0,25-0,57 мг/мл) у ранкові години з подальшим зниженням у вечірній і нічний час доби. Сполуки цього класу підвищують стійкість рослин проти фітопагенів. Виявлені результати збігаються з реакцією рослин на хітозан, що свідчить про універсальність захисних реакцій незалежно від природи їхньої індукції.

8. Регенераційну здатність інтактних рослин на прикладі *Rosa damascena* Mill. в умовах *in vitro* відзначено експлантатами на початку вегетації, коли загальний пул фенольних сполук у листках є найнижчим.

9. Для промислового мікроклонального розмноження і отримання рослин-регенерантів зі стійким адаптивним потенціалом сорту Лань застосовано

живильне середовище MS + 0,5 мг/л бензиламінопурину, + 0,01 мг/л індоліл-3-оцтової кислоти, Радуга – Андерсона з подвійним вмістом Fe<sup>2+</sup> 2,0 мг/л бензиламінопурину і Лань – QL + 2,0 мг/л бензиламінопурину. Ризогенез мікропагонів проявляється на середовищі ½ MS без додавання регуляторів росту. Додавання саліцилової кислоти (СК) в живильне середовище у концентрації 25 мг/мл значно прискорює процеси пагоноутворення. За умови використання екзогенної СК визначено обернену залежність ( $r = -0,90$ ) між площею листків і вмістом флавоноїдів. Без додавання СК рівень взаємозв'язків між даними показниками у рослин-регенерантів є порівняно низьким ( $r = 0,36$ ). Під впливом СК відбувається перебудова вторинного метаболізму, яка супроводжується синтезом біологічно активних сполук, зокрема терпеноїдів та кон'югатів оксикоричних кислот з властивостями регуляторів росту.

10. Сортоспецифічні цикли культивування рослин-регенерантів залежать від генотипів *Rosa damascena* Mill. і складу живильних середовищ. Найкоротший цикл (50 діб) характерний для сорту Лань, а найтривалиший (90 діб) – для сорту Лада.

11. Розроблено математичну модель циклічного біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження рослин на прикладі сортів *Rosa damascena* Mill., яка ґрунтуюється на інтегральних фізіологічних ознаках і дозволяє оптимізувати технологію безперервного отримання якісного садивного матеріалу.

12. Підібрано оптимальну композицію субстратної суміші для адаптації рослин-регенерантів сортів *Rosa damascena* Mill. до умов закритого ґрунту. Оптимізовано технологічні заходи ступінчастої адаптації сортів рослин на твердих субстратах (2 : 1 торф-перліт) в умовах *ex situ*, що дозволяє отримувати контейнерні культури з ефективністю адаптації 92 %. У процесі адаптації у листках і стеблах рослин-регенерантів поступово накопичувались фенольні сполуки, зокрема катехіни, просторовий розподіл яких в тканинах однорічних пагонів супроводжувався утворенням захисних гістохімічних бар'єрів.

13. Показано здатність фітопатогенного гриба *A. cucurbitacearum* 502 проникати у тканини кореня рослин (на прикладі *Cucumis sativus* L.), утворюючи внутрішньоклітинний міцелій. Уражуються, в основному, тканини кортекса (епідермальна і паренхіматозна). Провідні тканини (ксилема і флоема)

не колонізуються. Рослини сортів Ніжинський 12, Льоша, Журавльонок, Конкурент і Роднічок різняться по чутливості щодо гриба *A. cucurbitacearum* 502, зокрема найбільш уражалися сорти Ніжинський 12 і Льоша.

14. Культуральна рідина *A. cucurbitacearum* 502 у розведенні 1:10, 1:100 та 1:1000 не проявляє фітотоксичної активності щодо *Cucumis sativus* L., *Triticum aestivum* L. і *Lepidium sativum* L. та не змінює проліферативну активність клітин апікальної меристеми первинних корінців *Triticum aestivum* L., але порушує динаміку клітинного циклу, стимулюючи метафазу, анафазу (культуральна рідина в розведенні 1:100) та телофазу.

15. Для захисту рослин від акремоніозу, спричиненого *A. cucurbitacearum*, пропонується штам *T. viride* 017, який характеризується найшвидшим ростом і активним гіперпаразитизмом. Культуральна рідина *T. viride* 017, розбавлена у співвідношенні 1:50 та 1:500, стимулювала суху масу проростків на 20 і 29 % відповідно. Найбільш ефективним навантаженням на 1 насінину є 70 тис. КУО, біологічна ефективність 68 %.

Вцілому, завдяки унікальному комплексному поєднанні різносторонніх сучасних світових напрямів та методів досліджень, робота колективу авторів дозволила розкрити механізми ефективних адаптивних взаємодій рослин з мікроорганізмами у ризосфері, що дозволить оптимізувати нові екологічно обґрунтовані агрозаходи на фоні збереження гомеостазу екосистем.

Кількість публікацій за роботою – 60, у тому числі 32 статті (5 – Scopus, 2 - Web of Science), 1 монографія, 2 методичні рекомендації, 1 патент на корисну модель та 24 тези доповідей. Загальна кількість посилань на публікації та h-індекс за темою роботи: 54/3 (Google Scholar), 5/1 (Scopus). За даною тематикою захищено 3 кандидатські дисертації.

Олійник О.О.

Борко Ю.П.

Цехмістер Г.В.

Субін О.В.