

НУБІП України
МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – МР. 216 «С» 2023.02.15. 19 ПЗ
НУБІП України
УКРАЇНЦЯ ЦАВЛА ЮРІЙОВИЧА

НУБІП України
2023 р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

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

УДК 606:631.52:635.9
ПОГОДЖЕНО
Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та
екології
ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
Екобіотехнології та біорізноманіття

Коломієць Ю.В. 2023 р. « »
Кваско О.Ю. 2023 р. « »

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Вплив еліситорів на генетичну детермінацію факторів
резистентності в патосистемі *Quercus robur* - *Alternaria spp.*».
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

Лісовий М.М.

(підпис)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

д. с.-г. наук, доцент

Бородай В.В.

(підпис)

Виконав
Українець П.Ю.

КИЇВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

“ ” 2023р.

ЗАВДАННЯ

НА ВИПУСКНУ

МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Українцю Павлу Юрійовичу

1. Тема роботи «Вплив еліситорів на генетичну детермінацію факторів резистентності в патосистемі *Quercus robur* - *Alternaria* spp»

Керівник роботи Бородай В.В., д.с.-г.н., доцент

Затверджені наказом НУБіП України від 15.02.2023 року

2. Строк подання студентом роботи 25.10.2023
3. Вихідні дані до роботи рослини *Quercus robur*, ендofітні бактерії роду *Bacillus*, фітопатогенні гриби роду *Alternaria*, генетична детермінація факторів резистентності
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) опрацювати й дослідити літературні джерела, дослідити антифунгальну дію ендofітних бактерій роду *Bacillus*, дослідити вплив на саджанці дуба, оптимізувати умови проведення ППР

у реальному часі, проаналізувати експресію генів патоген-залежних (PR) білків саджанців дуба.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
	Бородай В.В.	10.10.2022	20.11.2022
	Бородай В.В.	15.10.2022	11.11.2022
	Бородай В.В.	29.11.2022	28.12.2022

6. Дата видачі завдання 10.10.2022

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної магістерської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Пошук літературних джерел і напрацювань по темі	Жовтень-листопад 2022	
	Пошук і опрацювання методик	Листопад 2022	
	Аналітична обробка інформації	Листопад 2022	
	Постановка експерименту	Листопад 2022 – вересень 2023	
	Опрацювання отриманих даних	Вересень – жовтень 2023	
	Оформлення роботи	Вересень – жовтень 2023	

Студент

(підпис)

Українець П.Ю.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Бородай В.В.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерська робота виконана на тему «Вплив еліситорів на генетичну детермінацію факторів резистентності в патосистемі *Quercus robur* - *Alternaria spp.*», виконана в обсязі 50 сторінки комп'ютерного формату А4, містить 5 таблицю, 20 рисунків, 30 використаних джерел. Складається з наступних розділів:

1. Огляд літератури
2. Об'єкти, матеріали та методи дослідження.
3. Вплив еліситорів на систему резистентності в патосистемі *quercus robur* - *alternaria spp.*
4. Вплив еліситорів на експресію генів в патосистемі *Quercus robur* - *Alternaria spp*

Дослідження проводилися в навчально-науково-виробничій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії на базі кафедри екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України.

Мета роботи: дослідити вплив еліситорів на генетичну детермінацію факторів резистентності в патосистемі *Quercus robur* - *Alternaria spp.*

Об'єкт досліджень: генетична детермінація факторів резистентності в патосистемі *Quercus robur* - *Alternaria spp.*

Предмет досліджень: рослини *Quercus robur*, ендоефітні бактерії роду *Bacillus*, фітопатогенні гриби роду *Alternaria*

Методи дослідження: емпіричні (експеримент, спостереження, опис) та теоретичні (аналіз і синтез, узагальнення, систематизація, класифікація), мікробіологічні, біотехнологічні, молекулярно-генетичні.

Для досягнення поставленої мети визначені наступні завдання:

1. Дослідити антифунгальну дію ендоефітних бактерій роду *Bacillus*
2. Дослідити вплив на саджанці дуба
3. Оптимізувати умови проведення ПЛР у реальному часі

4. Проаналізувати експресію генів патоген-залежних (PR) білків саджанців дуба

Актуальність теми: ендofітні мікроорганізми утворюють складний, унікальний і природно-вдосконалений симбіоз з рослинами. Такі взаємодії можуть не тільки сприяти росту і розвитку рослини, але й покращувати її систему захисту від патогенних мікроорганізмів та несприятливих умов навколишнього середовища. Таким чином, ендofіти можуть стати ефективним засобом захисту рослин та невід'ємною частиною як органічного землеробства, так і сільського господарства в цілому. Ця тема є актуальною та активно досліджується вченими з усього світу, але досі існує велика кількість запитань та аспектів, які необхідно вивчити, щоб у майбутньому успішно використовувати під час вирощування культур.

Ключові слова: ендofітні бактерії, дуб звичайний, *Quercus robur* L., ген, патоген-залежні (PR) білки, гени фенольного синтезу.

НУБІП України	Стор.
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.	12
1.1 Характеристика патосистеми «рослина-гриб»	12
1.1.1 Поняття «патосистема» й «патологічний процес»	12
1.1.2 Період до проникнення патогена в рослину	12
1.1.3 Проникнення патогена в рослину	13
1.1.4 Інкубаційний період патогена та патологічні зміни у рослин	17
1.2 Особливості стійкості деревних рослин проти хвороб та типи стійкості проти мікозів	24
1.3 Елісатори та їх роль у стійкості рослин	25
1.4 Генетична детермінація факторів стійкості	29
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	30
2.1. Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії навчально-науково-виробничої лабораторії біотехнології та клітинної інженерії	30
2.2. Збір та ідентифікація зразків дуба <i>Quercus robur</i> та патогенів <i>Alternaria spp.</i> опис об'єктів дослідження, методика визначення антифунгальної дії ендofітних бактерій щодо <i>Alternaria spp.</i>	30
2.3. Методи виділення РНК та отримання кДНК для проведення молекулярно-генетичних досліджень.	36
2.4. Вивчення реакції сіянців дуба на інфікування патогенами під впливом елісаторів.	37

2.5. Генетичний аналіз рослинних зразків для визначення генетичної основи резистентності.	37
-------------------------------------------------------------------------------------------	----

РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ ЕЛІСІТОРІВ НА СИСТЕМУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ В ПАТОСИСТЕМІ <i>QUERCUS ROBUR</i> -	42
------------------------------------------------------------------------------------------	----

ALTERNARIA SPP

3.1. Особливості взаємодії дуба з патогенами <i>Alternaria</i> spp	42
--------------------------------------------------------------------	----

3.2. Вплив ендофітних бактерій роду <i>Bacillus</i> на реакції саджанці дуба за ураження грибами роду <i>Alternaria</i> spp.	43
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

3.3. Вплив еліситорів на регенерацію тканин: особливості формування тканин	46
----------------------------------------------------------------------------	----

3.4. Вплив еліситорів на біохімічний статус рослин	46
----------------------------------------------------	----

РОЗДІЛ 4 Вплив еліситорів на експресію генів в патосистемі <i>Quercus robur</i> - <i>Alternaria</i> spp	48
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Quercus robur - *Alternaria* spp

4.1. Оптимізація умов проведення ПЛР у реальному часі	48
-------------------------------------------------------	----

4.2. Аналіз експресії генів патоген-залежних (PR) білків саджанців дуба	49
-------------------------------------------------------------------------	----

ВИСНОВКИ	51
----------	----

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52
----------------------------	----

ВСТУП

Отримання якісного матеріалу сіянців і саджанців деревних порід з метою лісовідновлення і лісорозведення входить в число основних завдань лісового господарства країни. Щорічно на лісокультурних об'єктах через

інфекційні хвороби і вплив несприятливих кліматичних факторів гинуть мільйони молодих рослин, що призводить до значних збитків (Краснов, Ткачук, Орлов, 2011; Мешкова, 2012; Бондаренко-Борисова, 2012).

Характерною особливістю лісових розсадників є концентрація на одиниці площі великої кількості (до 1,5-2 млн. шт./ га) сіянців хвойних, які на всіх стадіях розвитку – від проростків до 2-3-річного віку відрізняються низькою стійкістю до впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища, в тому числі до інфекційних захворювань.

Лісові насадження мають меншу різноманітність і стійкість, ніж природні ліси і, отже, більш сприйнятливі до хвороб. Коротка ротация в лісових плантаціях прискорює розвитку посилення вірулентності збудників кореневих гнилей, розвиток збудників епіфітотій (Soulague et al., 2017; Shestibratov et al., 2018). Крім того, глобальні зміни клімату сприяють поширенню патогенів лісових культур, наприклад поширенню хвороби кори бука в лісах Північної Америки (Stephanson, Ribarik, 2017).

Збудники хвороб рослин є природним компонентом агроєкосистем, а ступінь їх розвитку та шкідливість визначаються впливом декількох груп факторів, а саме: еколого-біологічних властивостей патогенів, генотипу рослини і умовами навколишнього середовища. В основі розробки сучасних раціональних заходів захисту від збудників хвороб деревних культур лежить розуміння особливостей життєвого циклу фітопатогенів з урахуванням всіх трьох груп факторів. Більшість популяцій фітопатогенних мікроорганізмів мають широкую спеціалізацію щодо різних видів хвойних. Істотна роль в патогенезі рослин відводиться фітопатогенним мікроцистам (Stephanson,

До найбільш поширених і небезпечних хвороб деревних порід (хвойні, клен, ясен, береза) в розсадниках України відноситься інфекційне вилягання, яке викликається фітопатогенними мікроміцетами *Fusarium spp.*, *Alternaria*. Значному ураженні може випадати 30-45%, а в окремих випадках 85- 100% рослин.

Вилягання характерне для молодих сянців сосни у віці до двох місяців. Найчастіше в кореневій шийці загиблих сянців поширені види роду *Fusarium*, а саме *F. avenaceum var. herbarum*, *F. sporotrichiella var. porotrichioides* і *F. solysporum var. orthoceras* (Городницька, Кузнєцова, 2012).

Ураження асиміляційного апарату сянців сосни і кедрі першого року життя викликають гриби родів *Alternaria* і *Cladosporium*: *A. alternate*, *A. geophila*, *A. solani*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*. Це призводить до зниження виходу стандартного садивного матеріалу та загибелі сянців, що досягає 10...40%.

Крім патогенних, в рослинному організмі існують мікроорганізми, які не завдають шкоди - ендofіти. Наразі вони є об'єктом вивчення науковців усього світу, і їх актуальність з року в рік не зменшується. Це можна пояснити здатністю ендofітів взаємодіяти з рослиною, впливаючи на синтез патоген-залежних білків, біологічно активних речовин та фітогормонів, і відповідно покращувати її ріст, розвиток та захисну систему.

Метою цього дослідження було вивчити, як ендofіти, що живуть у рослинах, впливають на включення генів, які забезпечують рослинам стійкість до стресу, та на утворення PR-білків, які борються з шкідниками. Оскільки ендofітна мікрофлора є дуже різноманітною та має різні способи взаємодії з рослинним організмом, ця тема є дуже актуальною та об'єднуючою. Її вивчення допоможе краще розуміти механізми захисту рослин та сприятиме їх покращенню, що матиме позитивний вплив на розвиток аграрної галузі.

Регулювання мікробного складу рослин може допомогти попередити рослинні хвороби, підвищити аграрну продуктивність, знизити використання хімікатів і зменшити викиди парникових газів, що сприятиме сталому розвитку сільського господарства. Ця ціль є дуже важливою в умовах невідомого зростання світового населення.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП УКРАЇНИ

Огляд патосистеми «рослина-гриб»

Поняття «патосистема» й «патологічний процес»

Патосистема – це підсистема екосистеми, яка характеризується феноменом паразитизму. Патосистема рослини – це така система, в якій господарем є рослина, а паразитом – гриб, бактерія, вірус, нематода або інший організм. Основна особливість концепції патосистеми полягає в тому, що вона

стосується саме паразитизму, а не окремого вивчення хазяїна чи паразита (Robinson, 1987).

Патогенні гриби є одними з найпоширеніших збудників хвороб рослин.

Взаємодія між рослиною-хазяїном та патогенним грибом являє собою складну

патосистему, яка включає механізми нападу з боку патогену та захисту з боку

рослини. Саму взаємодію рослини з патогеном, що призводить до порушення нормальної життєдіяльності організму господаря внаслідок захворювання, називають патологічним процесом. Це супроводжується типовими розладами

фізіологічних функцій органів та викликає зміни в анатомії і морфології

рослини (Перенеліца et al., 2023). Патологічний процес можна умовно розділити на два періоди: до і після проникнення патогена в рослину, але це розмежування не завжди чітке. На різних стадіях патологічного процесу

велику роль відіграють різні фактори: температура і вологість оточення,

патогенність збудника, чутливість або стійкість рослини-хазяїна, вплив інших

мікроорганізмів і т.д. Саме взаємодія цих чинників на кожному етапі визначає кінцевий результат патологічного процесу

(“ievtushenko_md_lisovii_mp_pantielieiev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu,” n.d.).

Період до проникнення патогена в рослину

Наявність періоду до проникнення патогена в рослину характерний для грибів та деяких квіткових паразитів. У грибів цей період найчастіше включає проростання спор з утворенням росткової трубки та її ріст на поверхні

рослини, або формування інших інфекційних структур. Проростають спори грибів по-різному залежно від: а) виду збудника; б) типу спор; в) умов зовнішнього

середовища ("ievvtushenko_md_lisovii_mr_pantielleiev_vk_sliusarenko_om_imu.

djvu," n.d.). Так, для проростання спор *Alternaria solani* з утворенням росткової трубки необхідна вільна волога (від дощу, зрошення, туману або роси) і сприятлива температура (від 20°C до 30°C) (Wharton and Kirk, 2012).



Конідія *Alternaria alternata*

Проникнення патогена в рослину

Існують три основні способи, якими патогени проникають у тканини рослин-живителів. По-перше, вони можуть проникати безпосередньо через кутикулу та епідерміс (пряме проникнення). По-друге, вони можуть потрапляти через природні отвори, такі як продиhi, гідатоиди чи сочевички.

По-третє, вони можуть проникати через поранення. Окремо слід згадати про непряме зараження, коли патогени переносяться комахами чи іншими

організмами

(“ievushenko_md_lisovii_mp_pantieliev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu,” n.d.).

Патогени потрапляють до рослин різними шляхами. Деякі використовують лише один спосіб проникнення, тоді як інші - кілька. Вибір шляху залежить від стадії розвитку патогену, його біологічних особливостей

та інших факторів

(“ievushenko_md_lisovii_mp_pantieliev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu,” n.d.).

Наприклад, *Alternaria solani*, що є збудником раннього фітофторозу картоплі, може проникати прямо через епідерміс, через природні отвори такі як породи, а також через поранення, які спричинені піском, механічними пошкодженнями або комахами (Wharton and Kirk, 2012).

Пряме проникнення відбувається безпосередньо через неушкоджені покривні тканини, такі як кутикула й епідерміс. При цьому, важливу роль відіграють фізико-хімічні властивості стінок клітин епідермісу й кутикули.

Після проростання на поверхні рослини, спори патогену певний час ростуть, випускаючи росткові трубки. Коли їх ріст припиняється, утворюється апресорій - спеціальна структура, за допомогою якої гриб прикріплюється до

поверхні рослини. Апресорій дозволяє патогену надійно закріпитися перед подальшим проникненням усередину рослини. Апресорії найчастіше

утворюються на листках та стеблах рослин. Проте вони можуть з'являтися і на коренях, незважаючи на відсутність там кутикули. Утворення апресоріїв

значно частіше стимулюється, ніж пригнічується. Відомі випадки, коли апресорії з'являлися навіть на рослинах, що не є хазяїнами даного патогену.

Після утворення апресорію на нижній його стороні з'являється інфекційна гіфа, яка має проникнути крізь кутикулу та потовщену зовнішню оболонку клітин епідермісу або міжклітинний простір. Щоб проникнути всередину, гіфі необхідно докласти значних зусиль. Тонка та загострена інфекційна гіфа у

більшості випадків досить тверда, оскільки має високий осмотичний тиск (до 7 атмосфер і вище). Це дає їй змогу проникати всередину без допоміжної дії ферментів. Встановлено, що інфекційні гіфи *Botrytis cinerea* здатні проникати

крізь мембрани з парафіну, колодію і навіть золота. Успішність проникнення залежить від товщини кутикули. Воно набагато легше в молоді листки з тоншою кутикулою, ніж у старі. Крім того, проникненню можуть сприяти каналці в кутикулі, що містять пектинові речовини, а також протоплазматичні тяжі (ектодесми) в зовнішній оболонці клітин епідермісу.

Через них відбувається виділення речовин на поверхню листків. Подальше проникнення інфекційної гіфи може відбуватися по-різному. У деяких грибів гіфи проходять між радіальними стінками клітин епідермісу, в інших міцелій розвивається між кутикулою та епідермісом і проникає в клітини епідермісу.

Проте в більшості випадків проникненню сприяє дія ферментів, які розм'якшують тканини, полегшуючи ріст гіфи і дію фізичного тиску. Важливу роль тут відіграють пектолітичні ферменти та целюлази. Цей процес відбувається досить швидко завдяки поєднанню фізичного тиску і ферментативного розм'якшення. Клітинна стінка набрякає, іноді майже повністю заповнюючи клітину. При цьому утворюються цукор та інші поживні речовини, які використовуються гіфами гриба ("ievushenko_md_lisovii_mr_pantieliev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu," n.d.).

У більшості рослин продихи розташовані на нижній стороні листків, від кількох сотень до кількох тисяч на 1 мм^2 . Винятком є злаки, конюшина та люцерна, в яких продихи переважно з верхнього боку. У більшості випадків розмір продихового отвору більший, ніж діаметр росткових трубок збудників хвороб. Тому вони фізично можуть проходити крізь продихи без перешкод. Після проростання спори, росткова трубка росте впоперек листка. Це пов'язано з більшою ймовірністю зустріти на шляху продих. Коли росткова трубка досягає замикаючих клітин, її кінець прикріплюється до поверхні останньої і утворює роздутий апресорій, що щільно прилягає до продиху.

Більша частина протоплазми трубки переміщується в апресорій. З його нижнього кінця виростає невелика проникаюча гіфа, яка прослизає між замикаючими клітинами продиху у підпродихову порожнину. Там гіфа

роздувається у міхурець, куди перетікає протоплазма з апресорію. Це частіше відбувається вночі, коли продиhi відкриті. Але за наявності краплинної вологи - і вдень, адже продиhi майже ніколи не закриті повністю, а гіфа може

розсовувати замикаючі клітини. Швидкість проникнення через продиhi залежить від виду гриба, зовнішніх умов, режиму роботи замикаючих клітин

продихів тощо. Цей процес може тривати від 6 до 12 годин. З підпродихового міхурця виростає інфекційна гіфа, що вступає в контакт з найближчою клітиною рослини-живителя. Подальший розвиток гриба залежить від

багатьох чинників: природи патогена, зовнішніх умов та реакції рослини-

живителя. Хоча на перший погляд проникнення через продиhi відбувається

набагато легше, проте грибів, що проникають таким чином, значно менше порівняно з тими, що проникають безпосередньо через покривні тканини. Це

пов'язано з тим, що спочатку росткова трубка має знайти відповідний продиh,

а потім подолати його можливу захисну реакцію. Крім того, після

проникнення у підпродихову порожнину, гриб повинен потрапити в найближчі клітини рослини, адже лише після цього встановлюється

фізіологічна взаємодія патогена і рослини-живителя

(“ievushenko_md_lisovii_mp_pantielieiev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu,” n.d.).

Через поранення проникають патогени, які не здатні подолати захисні утворення рослин у вигляді кутикули і перидерми. *Alternaria solani* й *Alternaria alternata* можуть проникати через поранення, незважаючи на те, що вони

здатні долати захисні утворення рослин (Wharton and Kirk, 2012),

(“ievushenko_md_lisovii_mp_pantielieiev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu,” n.d.).

Непряме зараження досить поширений спосіб проникнення патогенів з різних систематичних груп у рослини. Проникають вони через тканини й

органи, у яких взагалі не викликають симптомів хвороби, або ж вона в таких

умовах проявляється дуже слабо, після чого потрапляють в ті частини, на

яких паразитують. При зараженні через проростки, міцелій грибів

поширюється всередині рослинних тканин дифузно, зазвичай не викликаючи помітних ознак хвороби на початкових стадіях. Проте наприкінці

патологічного процесу симптоми проявляються дуже чітко у вигляді руйнування генеративних органів рослин. Таким чином, на останніх етапах ураження хвороба набуває яскраво виражених проявів. Зараження може відбуватися через кореневі волоски. На корінні можуть утворюватися нарости

внаслідок захисної реакції рослини проти проникнення збудника хвороби. Ці

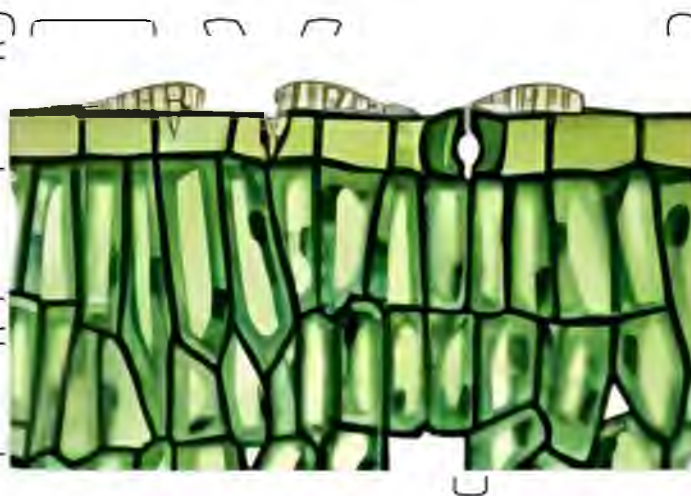
нарости є проявом антиінфекційного захисту, який запускається в рослині для боротьби з патогеном. При зараженні через бруньки, росткові трубки спор після проростання проникають через ці органи у рослину. Також може

відбуватися зараження рослини грибами через квітки. В багатьох випадках, це

відбувається через приймочку або нектарники. Спори грибів проростають на

приймочці, після чого росткові трубки проникають у зав'язь і насіння, де гриби зберігаються у вигляді міцелію, з часом можливо проникаючи в пагін

("ievtushenko_md_lisovii_mp_pantieliev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu," n.d.).



Ілюстрація можливих способів проникнення спор *Alternaria solani* у рослину (Tsedaley, 2014)

Інкубаційний період патогена

Подальше поширення патогена всередині зараженої рослини залежить

від багатьох чинників. Серед них - імунні властивості рослини-господаря,

патогенність збудника та умови навколишнього середовища. Тому не завжди

проникнення патогену в тканини означає, що він здатний там безперешкодно розвиватися. Існують різні механізми, які обмежують, а іноді й повністю

блокують можливості росту, поширення та репродукції збудника. Це призводить до формування несумісних взаємовідносин між рослиною-господаря та патогеном. Саме такі системи "рослина-патоген" і становлять

основний інтерес для фітоімунологів. Період від моменту проникнення грибів чи бактерій у тканини рослини до появи типових симптомів хвороби

називається інкубаційним. Протягом цього часу відбувається заселення тканин патогеном, але ознаки ураження ще не проявляються. Інкубаційний період передує власне розвитку хвороби. У сумісних системах "рослина-

живитель - патоген" існує багато різних способів заселення зараженої рослини.

Розрізняють такі способи заселення зараженої рослини: ектопаразитичний, ендopазитичний розвиток за наявності поверхневого міцелію, субкутикулярний розвиток, ендopазитичний розвиток у паренхімній

тканині. При ектопаразитичному способі заселення, міцелій гриба знаходиться переважно на поверхні зараженої тканини, а живиться за рахунок гаусторій,

що проникають у клітини епідермісу, а іноді й мезофілу. На поверхневому міцелії гриба утворюються структури для статевого та нестатевого розмноження. Найбільш типовими представниками грибів, що заселяють

рослини таким чином, є борошнисторосяні гриби з родів *Cladosporium* та

Acremonia. Ендopазитичний розвиток з наявністю поверхневого міцелію. За такого способу поверхневий міцелій у багатьох місцях проникає всередину тканин рослини, спричиняючи множинне зараження. Це призводить до

швидкого заселення тканин. На поверхневому міцелії в цей час формуються органи розмноження гриба. Таким чином, патоген одночасно колонізує

рослину ззовні та зсередини. При субкутикулярному розвитку, гриби паразитують переважно між кутикулою та епідермісом, випускаючи всередину клітин епідермісу, а іноді й мезофілу, спеціальні гаусторії. До них

належать високоспеціалізовані збудники (*Venturia inaequalis* Wint., *V. Pirina* Aderh.), які не відразу вбивають клітини рослини, а повільно використовують

їх. На поверхні рослини вони утворюють конідіальне спороношення, котре зрештою розриває кутикулу. Ендopазитичний розвиток у паренхімній

тканини характерний для більшості грибів, що заселяють паренхімні клітини кори або мезофілу. Характер росту цих патогенів після проникнення залежить від їх виду та рівня спеціалізації, типу і віку тканин рослини-живителя та інших факторів. Наприклад, гіфи вузькоспеціалізованих грибів роду *Taphrina* spp. здатні рости лише між клітинами, отримуючи поживні речовини крізь мембрани сусідніх клітин. У широкоспеціалізованих некротрофних грибів, таких як *B. sterea* чи *Wh. sclerotiorum*, гіфи переважно ростуть всередині клітин, розгалужуючись та переходячи з однієї клітини в іншу, швидко заселяючи всі тканини. Такі паразити зазвичай виділяють ферменти й токсини, що призводить до швидкої загибелі клітин. Деякі гриби, наприклад *Pythium deboryanum* Hesse, можуть рости як в міжклітинниках, так і всередині клітин, залежно від типу і віку рослинних тканин. У більшості спеціалізованих біотрофів, таких як *Peronosporaceae*, *Albuginaceae*, *Erysiphales* та *Uredinales*, що є міжклітинними або ектопаразитичними патогенами, гіфи ростуть між клітинами, а гаусторії проникають у клітини рослини-живителя та поглинають з них поживні речовини. Гаусторії можуть мати різну форму і розмір, навіть розгалужуватися всередині клітини, але зазвичай не проростають крізь клітинну стінку, а лише вдавлюють її в цитоплазму (явище інвагінації). Так утворюється так звана екстрагаусторіальна зона у вигляді футляра - двохшарової мембрани зі структур патогена та рослини-живителя. Вона забезпечує тісний контакт між цими організмами, нагадуючи симбіоз - відбувається обмін речовинами. При цьому клітина тривалий час залишається життєздатною, оскільки гаусторії мінімально її пошкоджують. Спорношення в таких випадках утворюється раніше, ніж гине клітина ("Ievlushenko_md_lisovii_mr_pantelichev_vk_skusarenko_om_imu.djvu," n.d.)

Патологічні зміни у рослини

Під час інкубаційного періоду у хворих рослин відбуваються патоморфологічні та патофізіологічні зміни, що проявляються у вигляді симптомів захворювання. Симптоми можуть бути елабкими або різко вираженими, залежно від властивостей та агресивності патогена,

імунологічних особливостей рослин, умов навколишнього середовища та інших факторів.

(“ievushenko_md_lisovii_mp_pantieliev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu,” n.d.)

Патоморфологічні зміни виявляються у порушенні росту та зміні форми всієї рослини або окремих її органів. Порушення росту найчастіше

виявляється у його пригніченні. Наприклад, при ураженні пшениці карликовою сажкою (збудник *Tilletia contraversa* Kuehn.), соняшнику несправжньою борошнистою росю (збудник *Plasmopara helianthi* Novot.), а

також при системному ураженні зернобобових культур пероноспоровими

грибами, спостерігається вкорочення міжвузлів, що викликає карликовість рослин. Патологічний процес також призводить до інших анатомо-

морфологічних змін, що виявляються у вигляді різних деформацій рослин та їх органів (заляльковування, утворення розеток, кучерявість, ниткоподібність

і папоротеподібність листя, гіпертрофія, гіпоплазія, дегенерація і склеротинізація клітин, аномалії генеративних органів, некроз флоєми.

паренхіми, колленхіми, розрив епідермісу, мацератія тканин тощо) (“ievushenko_md_lisovii_mp_pantieliev_vk_sliusarenko_om_imu.djvu,” n.d.).

Патофізіологічні зміни виявляються у порушенні водного режиму,

фотосинтетичної активності та вуглеводного обміну, а також процесу дихання рослин. Порушення водного режиму рослин відбувається переважно через порушення надходження води в рослину внаслідок ураження кореневої та

судинної системи, а також посилення транспірації через пошкодження

покривних тканин та порушення роботи продохів. Це, в свою чергу, може призводити до змін в обміні речовин (посилення гідролізу та послаблення або

повне припинення біосинтезу). Порушення фотосинтезу і вуглеводного обміну може відбуватися через зменшення асиміляційного апарату внаслідок

часткового відмирання листової поверхні або її вкриття міцелієм гриба, а

також порушення процесу та відтоку продуктів фотосинтезу через відмирання клітин флоєми. Порушення фотосинтезу призводить до порушення

вуглеводного обміну. Оскільки вуглеводи - основне джерело енергії як для

рослини, так і для патогену, то під час захворювання їх використання значно інтенсифікується через підвищену активність окисно-відновних процесів, викликану патогенезом. Це спричиняє вуглеводне виснаження рослинного організму та переважання процесів гідролізу складних запасних форм вуглеводів. Порушення дихання виявляється в його активізації на початкових етапах патогенезу, а згодом - зниженні. Це пов'язано зі зростанням активності окислювальних ферментів (пероксидази і поліфенолоксидази) у декілька разів, що призводить до порушення обміну речовин, всі ланки якого контролюють ферменти

(“tevtushenko_md_lisovii_mp_pantielieiev_vk_sliusarenko_om_mudjvu,” n.d.).

Плагоморфологічні та патофізіологічні зміни у рослин супроводжуються появою зовнішніх ознак (симптомів) захворювань. Їх різноманітність можна об'єднати в декілька основних типів: гнилі, плямистості, нальоти, зміна забарвлення органів (мозаїки, хлорози), в'янення, нарости, деформації рослин і окремих органів, руйнування органів, пустули, спотворення та порушення функцій генеративних органів, опадання і всихання квіток та молодих плодів, муміфікація тощо. Залежно від збудника, одне захворювання може проявлятися у вигляді декількох симптомів

(“tevtushenko_md_lisovii_mp_pantielieiev_vk_sliusarenko_om_mudjvu,” n.d.).

Основи стійкості рослин проти хвороб

1.1 Загальна характеристика категорій рослинного імунітету

Упродовж усього онтогенезу рослини перебувають у контакті з численними потенційно паразитичними мікроорганізмами. Насіння проростає у ґрунті, де безліч мікроорганізмів, що перебувають у стані спокою і чекають появи коріння, що своїми метаболітами стимулює перехід їх до активного стану. На надземні органи рослин повітряними потоками та краплинами дощу заносяться спори грибів та бактеріальні клітини. За сприятливих умов температури та вологості виникає можливість їх зараження

(“ievushenko_md_lisovii_mp_pantieliev_vk_sliusarenko_om_jm.djvu,” n.d.).

У процесі еволюції між рослинами та шкідливими організмами склалися певні взаємовідносини, внаслідок яких рослини або гинуть, або набувають здатності протистояти паразиту (імунітету). У рослин розрізняють два основні типи імунітету: вроджений (природний), і набутий (штучний).

Вроджений імунітет - це властивість рослин не уражатися (не пошкоджуватися) тією чи іншою хворобою (шкідником). Вроджений імунітет передається у спадок із покоління в покоління. Розрізняють пасивний і активний вроджений імунітет.

Пасивний імунітет полягає в здатності рослин протистояти проникненню та розвитку збудника хвороби, незважаючи на контакт з ним. Це зумовлено переважно анатомічними, морфологічними, фізіологічними, біохімічними та іншими особливостями рослин, притаманними їм незалежно від наявності патогену.

Активний імунітет - це здатність рослини чинити активний опір збуднику захворювання на певних етапах патологічного процесу. Він найчастіше проявляється у формі захисних реакцій після проникнення патогена в тканини рослини-живителя.

Поділ вродженого імунітету на пасивний та активний є досить умовним, оскільки є підстави вважати, що явища як активного, так і пасивного імунітету у рослин є результатом їх пристосування до певного типу взаємин з патогеном протягом тривалої спільної еволюції.

Підвищення стійкості рослин під впливом зовнішніх факторів, що протікає без зміни геному, отримало назву набутої або індукованої стійкості. Чинники, вплив яких на насіння або рослини призводить до підвищення стійкості рослин, називаються індукторами або елісаторами.

Набутий імунітет - це властивість рослин не уражатися тим чи іншим збудником хвороби, яка виникла у рослин після перенесення захворювання або під впливом зовнішніх чинників, особливо умов обробітку рослин. У межах набутого імунітету розрізняють інфекційний імунітет, що є результатом

одужання рослин після хвороби, наявність якого тривалий час була під сумнівом, та неінфекційний, який виникає під впливом на рослини в різних етапах онтогенезу імунізуючих засобів (застосування мінеральних добрив, мікроелементів, антибіотиків, спеціальних хімічних речовин-імунізаторів тощо).

Імунітет рослин може бути зумовлений нездатністю збудника викликати зараження рослин певного виду. Так, зернові культури не уражаються фітофторозом і паршею картоплі, капуста - сажковими хворобами, картопля - іржавинними хворобами зернових культур тощо. У цьому разі імунітет

проявляється видом рослин загалом. Імунітет, що ґрунтується на нездатності збудників викликати зараження рослин певного виду, називається неспецифічним. Природний неспецифічний імунітет захищає рослину від великої кількості сапротрофних видів, що оточують її, які в процесі еволюції не набули властивостей, що забезпечують здатність паразитувати на рослинах цього виду.

У деяких випадках імунітет може проявлятися не видом рослин загалом, а лише окремим сортом у межах цього виду. У такому разі одні сорти імунні й не уражаються хворобою, інші - сприйнятливі й уражаються нею сильнішою мірою. Так, збудник раку картоплі *Synchytrium endobioticum* вражає вид *Solanum*, однак усередині нього є сорти (Камераз, Столовий 19 та ін.), що не уражаються цією хворобою. Такий імунітет називають сортовим специфічним. Він має велике значення при виведенні стійких сортів сільськогосподарських рослин.

У низці випадків рослини можуть мати імунітет до збудників різних хвороб. Наприклад, сорт озимої пшениці може бути імунним до збудника і борошнистої роси, і бурої стеблової іржі. Стійкість сорту або виду рослин до кількох збудників називається комплексним або груповим імунітетом.

Особливе місце серед категорій імунітету займає толерантність - здатність певного сорту неістотно знижувати врожайність і якість врожаю, попри досить високий рівень ураження хворобою.

НУБІП УКРАЇНИ

Фактори пасивного імунітету

Стійкість рослин зумовлена комплексною дією різних чинників.

Механізми або чинники стійкості можна поділити на дві групи:

- чинники, що діють до зараження (передінфекційні);
- чинники, що діють після зараження (постінфекційні).

НУБІП УКРАЇНИ

Фактори (механізми) стійкості першої групи присутні в рослині незалежно від ураження патогеном, другої – індукуються збудниками (до цієї групи належить і зміна активності генів). Серед чинників, що діють до зараження, можна виділити анатомо-морфологічні, фізичні та хімічні.

НУБІП УКРАЇНИ

12 Особливості стійкості деревних рослин проти хвороб та типи стійкості проти мікозів

НУБІП УКРАЇНИ

Деревні рослини, як і будь-які інші живі організми, піддаються ураженню різноманітними хворобами. Особливо небезпечними для них є грибкові захворювання або мікози. Вони можуть призводити до послаблення, всихання і навіть загибелі дерев. Тому дуже важливою є стійкість деревних порід проти мікозів.

НУБІП УКРАЇНИ

Існують певні особливості стійкості дерев саме проти грибкових хвороб. Це пов'язано з тривалим життєвим циклом деревних рослин та їх взаємодією із збудниками хвороб протягом багатьох років. Стійкість формується поступово, у процесі природного добору.

НУБІП УКРАЇНИ

Розрізняють кілька типів стійкості деревних порід проти мікозів:

Вертикальна стійкість - стійкість окремих генотипів або клонів рослин в межах виду. Вона залежить від генетичних особливостей рослини.

Горизонтальна стійкість - стійкість в межах популяції та видів.

НУБІП УКРАЇНИ

Визначається різноманітністю генотипів в популяції

Відносна стійкість - здатність деревних рослин протистояти певним видам збудників хвороб.

Абсолютна стійкість - повна несприйнятливість рослини до певного патогену. Зустрічається рідко.

Цельова стійкість - стійкість рослин за природних умов зростання.

Штучна стійкість - стійкість за штучного інфікування в лабораторії чи розсаднику.

Основними чинниками стійкості деревних рослин проти мікозів є:

Анатомічна будова - товщина кутикули, опушення листя, наявність пробкового шару. Ускладнюють проникнення збудників.

Хімічний склад тканин - наявність фенольних сполук, антибіотичних речовин, інгібіторів ферментів патогенів.

Фізіологічні реакції - синтез фітоалексинів, PR-білків, лігніну.

Відповідь на проникнення збудника.

Несприятливі умови в тканинах - кисла реакція середовища, відсутність поживних речовин.

Наявність ендofітних мікроорганізмів - пригнічують розвиток патогенів.

Генетична стійкість - наявність генів стійкості (R-гени).

Для підвищення стійкості деревних порід застосовують різні методи. Це селекція на стійкість, обробка рослин імуномодуляторами, використання ендofітів. Важливе значення має комплексний підхід до захисту лісових насаджень.

Отже, стійкість деревних рослин до мікозів має певні особливості та визначається комплексом чинників. Вивчення механізмів стійкості дає змогу ефективніше захищати лісові екосистеми від небезпечних грибкових хвороб.

1.3 Еліситори та їх роль у стійкості рослин

Еліситори - це речовини, які запускають захисні реакції рослин проти патогенів. Генетична детермінація відповіді рослин на еліситори означає, що

сприйнятливості рослини до певного елісатора та інтенсивність її відповіді залежать від генотипу цієї рослини.

Основні моменти

Рослини по-різному реагують на однакові елісатори залежно від їх генетичних особливостей.

Деякі гени визначають наявність рецепторів для сприйняття певних елісаторів. Якщо рецептори відсутні, елісатор не сприймається.

Інші гени регулюють каскади сигнальних шляхів і активацію захисних генів у відповідь на елісатор. Їх експресія визначає силу відповіді.

Мутації в цих генах можуть призводити до повної втрати чутливості до елісатора або до гіперчутливості.

Селекціонери використовують генетичні маркери для створення сортів з підвищеною стійкістю до хвороб за допомогою елісаторів.

Отже, генетика рослини істотно впливає на те, як вона реагуватиме на певні елісатори та наскільки ефективною буде індукована стійкість.

Елісатори можуть впливати на генетичну детермінацію факторів резистентності рослин наступними способами:

Елісатори активують експресію генів, що кодують білки-рецептори, які розпізнають молекулярні структури патогенів. Це посилює неспецифічну резистентність.

Вони індукують синтез антимікробних сполук (фітоалексини, PR-білки), активуючи відповідні гени захисту. Це сприяє хімічній резистентності.

Елісатори можуть модулювати експресію генів сигнальних шляхів, які регулюють захисні реакції, змінюючи їх чутливість.

Вони запускають епігенетичні зміни (метилування ДНК, модифікації гістонів), які впливають на доступність генів захисту для транскрипції.

Елісатори можуть індукувати мутації у генах захисту, підвищуючи генетичне різноманіття популяції і шанси на відбір стійких форм.

Використання еліситорів у селекції дозволяє відбирати рослини з підвищеною експресією корисних алелів генів стійкості.

Отже, еліситори є важливим інструментом модифікації генетично детермінованої резистентності рослин, діючи на різних рівнях регуляції експресії відповідних генів.

Ендоефітні бактерії роду *Bacillus* можуть виконувати роль еліситорів та впливати на генетичну детермінацію факторів резистентності рослин наступним чином:

Вони можуть продукувати широкий спектр біологічно активних речовин – ліпополісахариди, *peptidoglycans*, циклічні ліпопептиди, що діють як еліситори.

Ці речовини зв'язуються з рецепторами рослин, запускаючи каскади захисних реакцій та експресію генів стійкості.

Бактерії *Bacillus* індукують синтез фітоалексинів, PR-білків, посилюють синтез антимікробних сполук рослиною.

Вони можуть підвищувати стійкість рослин до патогенів шляхом колонізації та конкуренції за нішу та поживні речовини.

Деякі штами здатні пригнічувати ріст фітопатогенів за рахунок продукування антибіотиків.

Bacillus стимулюють ріст рослин, активуючи гени, що регулюють розвиток кореневої системи та поглинання поживних речовин.

Отже, ендоефітні бактерії *Bacillus* можна розглядати як потенційних еліситорів, здатних модифікувати генетично детерміновану стійкість рослин до стресів біотичної та абіотичної природи.

Alternaria – це рід грибів, деякі види якого є фітопатогенами та можуть викликати хвороби у рослин.

Особливості ураження сіянців дуба грибами роду *Alternaria*:

Найбільш поширений і небезпечний вид - *Alternaria alternata*. Викликає кореневу гниль сіянців дуба.

Захворювання проявляється у вигляді побуріння і відмирання кореневої системи та основи стебла.

Гриб проникає через пошкодження коренів, поширюється вгору по стеблу судинними пучками.

Уражені рослини відстають у рості, всихають, часто гинуть. Хвороба особливо небезпечна для сіянців у розсадниках.

Для профілактики рекомендується дезинфекція ґрунту, використання стійких сортів дуба, фунгіцидне оброблення розсадників.

При появі ознак хвороби уражені рослини видаляють і спалюють, щоб зменшити інфекційне навантаження.

Отже, *Alternaria* може завдати значної шкоди сіянцям дуба, тому потребує уважного контролю та профілактики цієї хвороби у розсадниках.

Alternaria - це рід фітопатогенних грибів, метаболіти яких можуть виконувати роль еліситорів рослин.

Основні елісители *Alternaria*:

Альтенуєн - сесквітерпеновий метаболіт, індукуює синтез фітоалексинів, PR-білків, посилює стійкість до патогенів.

Брасиностероїди - інгібують синтез етилену, модулюють захисні реакції.

Полісахариди клітинної стінки - індукують окисний вибух та накопичення РК у рослині.

Білки оболонки спор - запускають захисні реакції через взаємодію з рецепторами.

Меланіни - посилюють синтез захисних сполук, лігніфікацію.

Ензими *Alternaria* - проявляють еліситорну активність.

Отже, *Alternaria* продукує різноманітні елісители, які можна використовувати для індукції імунітету рослин до хвороб.

Культуру грибів *Alternaria* культивували на живильному середовищі в колбах на качалках, потім автоклаували, екстрагували полісахариди

клітинної стінки і використовували їх в якості еліситорів для інфікування тканин дубу.

НУБІП УКРАЇНИ

1.4. Генетична детермінація факторів стійкості

Еліситори - це речовини, які запускають захисні реакції рослин проти патогенів. Генетична детермінація відповіді рослин на еліситори означає, що сприйнятливість рослини до певного елісатора та інтенсивність її відповіді залежать від генотипу цієї рослини.

НУБІП УКРАЇНИ

Основні моменти:

Рослини по-різному реагують на однакові еліситори залежно від їх генетичних особливостей.

НУБІП УКРАЇНИ

Деякі гени визначають наявність рецепторів для сприйняття певних еліситорів. Якщо рецептори відсутні, еліситор не сприймається.

Інші гени регулюють каскади сигнальних шляхів і активацію захисних генів у відповідь на еліситор. Їх експресія визначає силу відповіді.

НУБІП УКРАЇНИ

Мутації в цих генах можуть призводити до повної втрати чутливості до елісатора або до гіперчутливості.

Селекціонери використовують генетичні маркери для створення сортів з підвищеною стійкістю до хвороб за допомогою еліситорів.

НУБІП УКРАЇНИ

Отже, генетика рослини істотно впливає на те, як вона реагуватиме на певні еліситори та наскільки ефективною буде індукована стійкість.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії навчально-науково-виробничої лабораторії біотехнології та клітинної інженерії

Дослідження проводилися в навчально-науково-виробничої лабораторії біотехнології та клітинної інженерії на базі кафедри екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України. Використовувалося таке обладнання: ПЦР-ампліфікатор, бокс безпеки для підготовки проб з метою проведення молекулярно-генетичних досліджень, ультрацентрифуга, вортек, термостат.

2.2 Ідентифікація зразків дуба *Quercus robur* та патогенів *Alternaria spp.*, та ендоефітних бактерій, методика визначення антифунгальної дії ендоефітних бактерій щодо *Alternaria spp.*

Як рослини-донори було обрано багатолітні дерева *Q. robur* із ознаками підвищеної стійкості проти фітопатогенів і шкідників.

Дослідження проводили в навчально-науковій лабораторії клітинної інженерії та біотехнології й лабораторії промислової біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Об'єктами досліджень слугували ізоляти ендоефітних мікроорганізмів, виділені з тканин зародків недозрілих жолудів дубу; культури фітопатогенних мікроміцетів, збудники хвороб деревних рослин.

Виділення ендоефітних бактерій з тканин зародків недозрілих жолудів дубу проводили згідно з (Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень, 2017). Для подальших досліджень відбирали бактерії, які вирости після 4-5 днів культивування в термостаті (24-26°C). Особливу увагу звертали на колонії бактерій з більшою частотою трапляння (Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень, 2017).

Культивування мікроорганізмів проводили на картопляно-глюкозному агарі. Ізоляти ендоспійних мікроорганізмів ідентифікували за морфологічними та культуральними властивостями згідно з загально визнаними у бактеріології та мікології методами (Бельтюкова та ін., 1968; Dudka et al., 1982; Герхард та ін., 1983; Попкова, Шмыгля, 1987; Билай і др., 1988; Ратука et al., 2017).

Для встановлення видової ідентифікації штамів BHFHB і BSFHB був проведений молекулярно-генетичний і філогенетичний аналіз, який включав секвенування гену 16S рРНК та порівняння отриманої послідовності з внесеними у ГенБанк. У результаті секвенування були отримані фрагменти розміром 1454 (BHFHB) і 1456 (BSFHB) п.н., для яких виявлено 99,86% схожості до *B. halotolerans* LMG 22477 (BHFHB) та 99,73% до *B. subtilis* JCM 1465 (BSFHB).

На основі послідовностей гену 16S рРНК досліджуваних штамів та інших видів роду *Bacillus* побудовані філогенетичні дендрограми, які відображають ступінь генетичної подібності між різними видами бацил (рис.). Як видно з рис. досліджувані штами сформували окремі групи з типовими штамми видів *B. halotolerans* (BHFHB) та *B. subtilis* (BSFHB), що підтверджує їх видову приналежність до цих видів.

Сиквеновані послідовності гену 16S рРНК внесені до бази даних
ГенБанк з номерами OR262489 (BHFHB) і OR262490 (BSFHB)

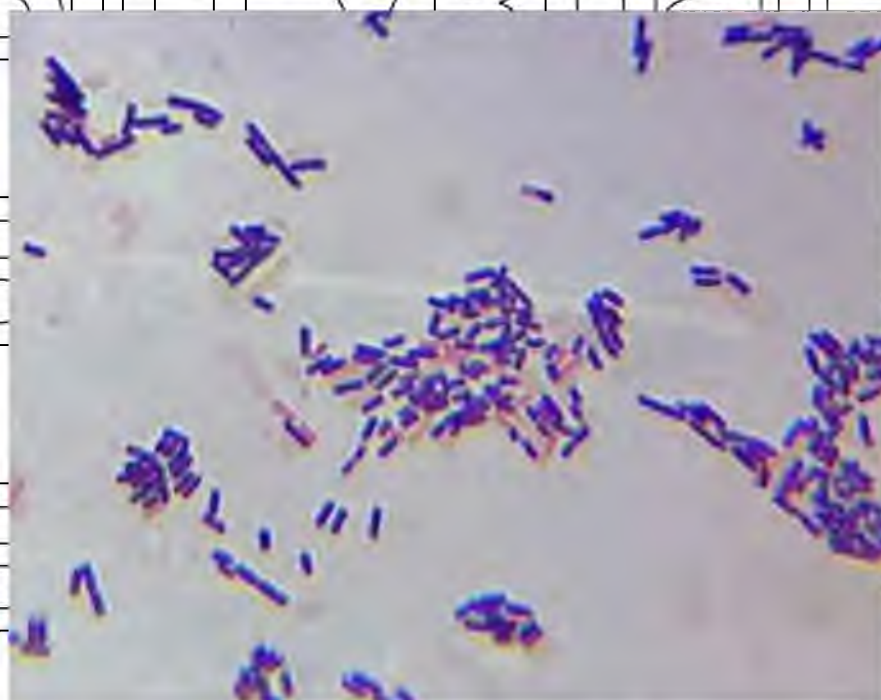


Рис. Профарбовані за Грамом бактерії роду *Bacillus*

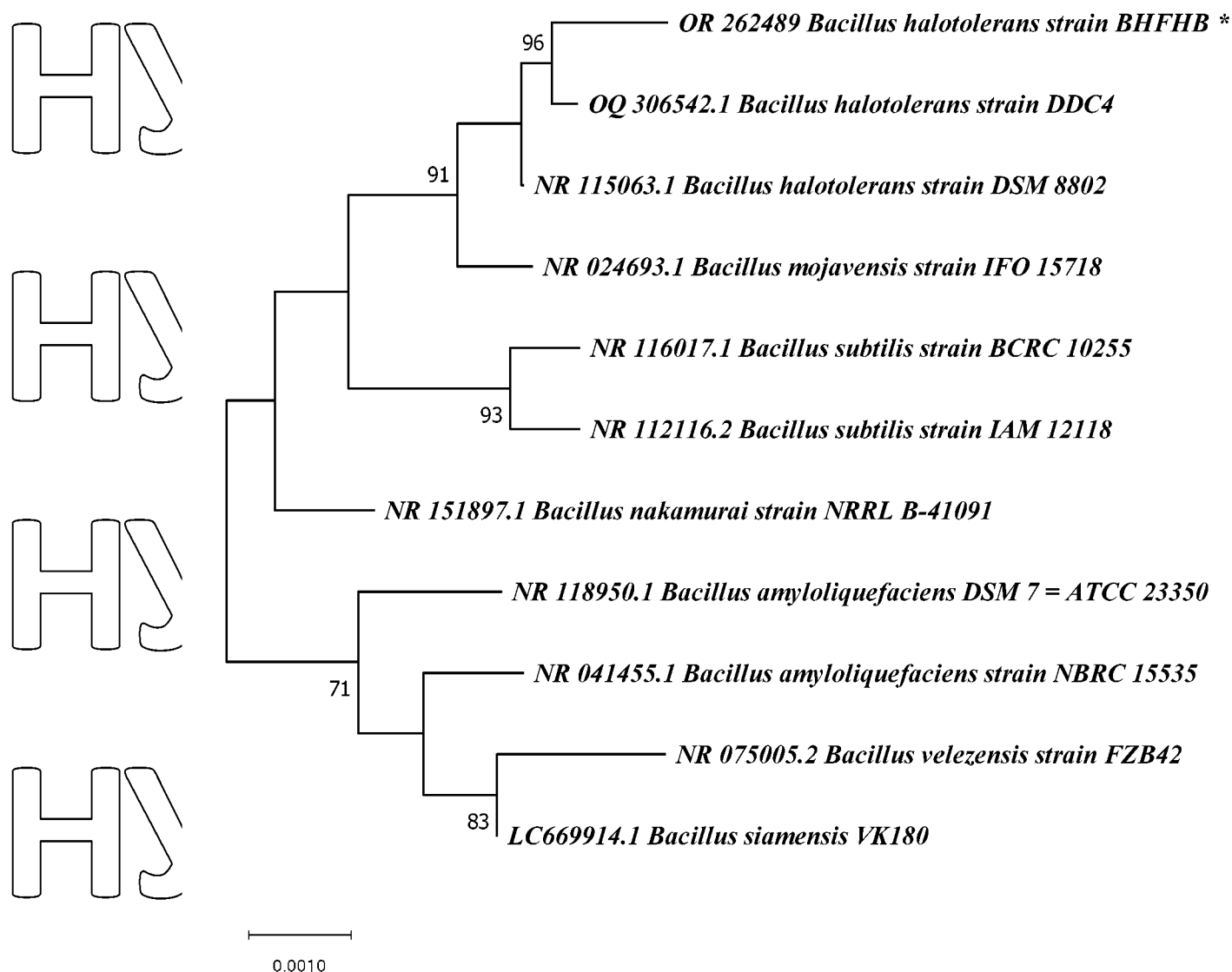


Рис. Дендрограма генетичної подібності між типовими штамами роду *Bacillus* та штамом *Bacillus halotolerans* BHFHB, побудована на основі сиксенів гену 16S рРНК з використанням методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням 2-параметричної моделі

Кімури

НУБІП України

НУБІП України

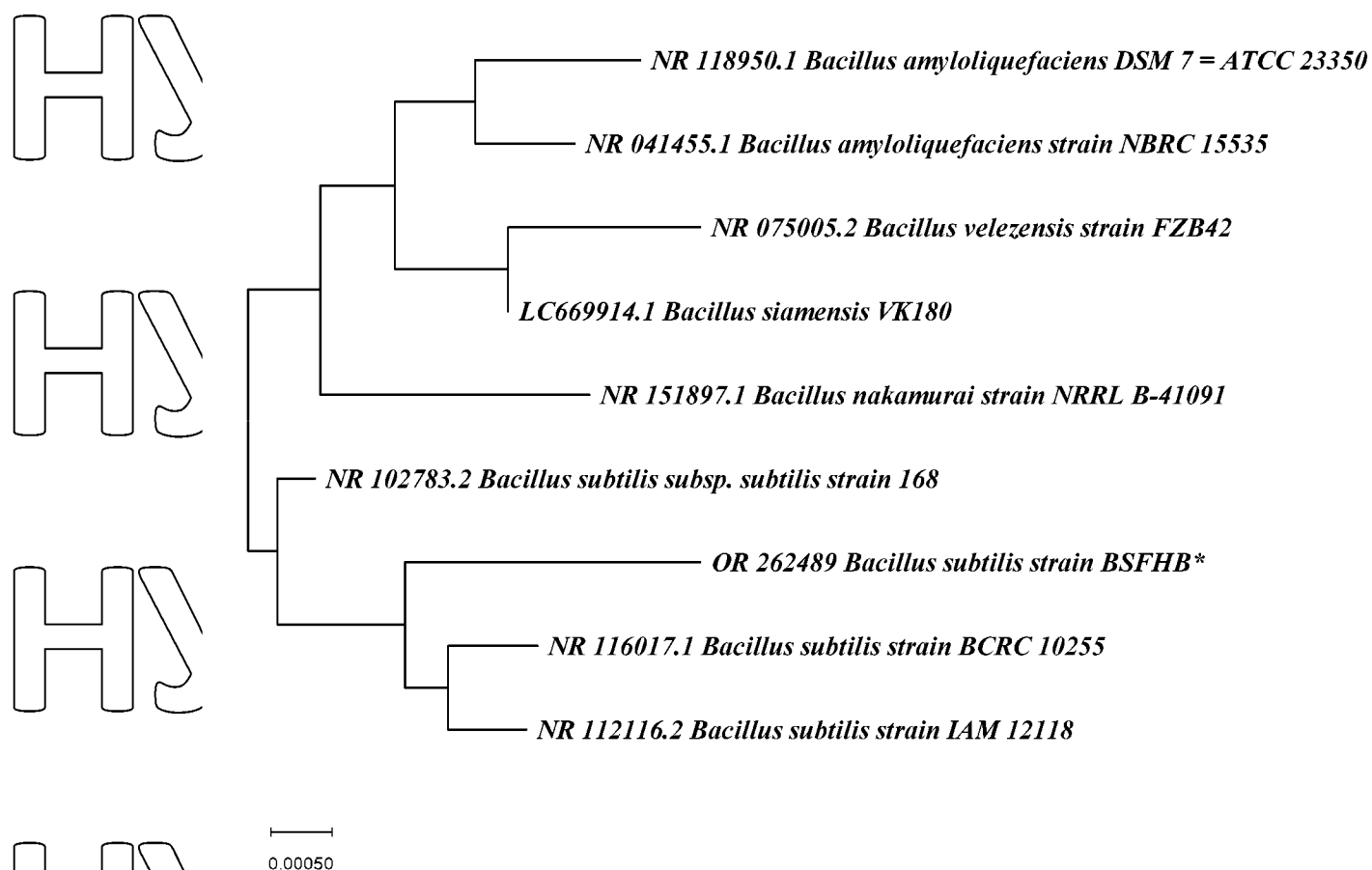


Рис. Дендрограма генетичної подібності між типовими штамами роду *Bacillus* та штамом *Bacillus subtilis* BSFHB, побудована на основі сиксенсів гену 16S рРНК з використанням методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням 2-параметричної моделі Кімури.

З тканин дубу та буку у 2022 році було виділено домінантні морфотипи грибів та бактерій, які були генетично ідентифіковані та внесені до ГенБанку.

З тканин дубу з симптомами ураження підпаром, було виділено гриби, ідентифіковані в подальшому за допомогою сиквенування ITS-послідовностей як *Fusarium solani* FSHRO (коефіцієнт подібності з типовим штамом становив 99,63%).

З тканин буку з симптомами ураження несправжнім ядром було виділено мікроміцети, ідентифіковані в подальшому за допомогою

сиквенування ITS-послідовностей як *Alternaria alternata* AAFHB (коефіцієнт подібності між штамом AAFHB і представниками виду *A. alternata* склав 100%)

Сиквеновані послідовності *A. alternata* AAFHB внесено у базу ГенБанк з номером OR263185 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/OR263185>),

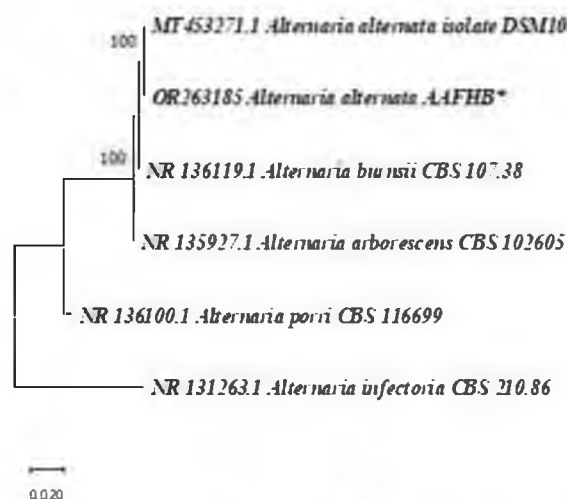


Рис. Дендрограми генетичної подібності між типовими штамми роду *Alternaria* та штамом *A. alternata* AAFHB (A), побудовані на основі сиксенсів ITS-послідовності з використанням методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням 2-параметричної моделі Кімури.

У результаті сиквенування ITS-послідовності були отримані фрагменти розміром 543 п.н. (штам AAFHB) і 539 п.н. (штам FSHRO).

Порівняльний аналіз з нуклеотидними послідовностями у базі даних ГенБанк і з використанням алгоритму blastn виявив, що відсоток подібності між штамом AAFHB і представниками виду *Alternaria alternata* склав 100%, зокрема зі штамом *A. alternata* DSM100286.

Для уточнення філогенетичного положення цих штамів були побудовані дендрограми генетичної подібності між досліджуваними штамми та іншими представниками родів *Alternaria* та *Fusarium* (рис.). Як видно з дендрограм штам *A. alternata* AAFHB формує групу з типовим штамом,

A. alternata DSM 100286, яка достовірно відмежовується від інших видів *Alternaria*.

Отже, за результатами проведеного секвенування ITS-послідовності штаму AAFNB встановлено, що він належить до виду *A. alternata*.

Секвеновані послідовності внесено у базу ГенБанк з номерами OR263185

Визначення антифунгальної активності виділених ізолятів щодо збудників мікозів рослин томатів *Fusarium oxysporum* Schlecht *Alternaria solani* Sorauer, *Botrytis cinerea* Pers., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Fusarium sambucinum* Fuckel проводили модифікованим експрес-методом лунок (Dudka et al., 1982).

2.5. Методи виділення кДНК і РНК для проведення молекулярно-генетичних досліджень

Для того, щоб виконати такі процедури і дослідження, як: зворотна транскрипція, ПЛР-аналіз, електрофорез, секвенування тощо, необхідно мати чистий генетичний матеріал з рослини. Існують різні методи, які допомагають отримати такий матеріал, і вони складаються з попередніх і основних кроків. Ці методи можуть відрізнятися за часом, концентрацією та якістю отриманого продукту. При виборі методу слід враховувати специфіку рослинного матеріалу та мету дослідження.

Для того, щоб виділити НК з рослинного матеріалу, спочатку потрібно розбити клітинну стінку механічним способом і додати буферний розчин, який лізує клітини. Таким чином, утворюється гомогенат, який містить усі складові клітини.

Для того, щоб очистити НК від інших складових клітин (протеїнів, ліпідів, полісахаридів, мікроелементів тощо), потрібно використати один з методів: рідкофазний або твердофазний. Рідкофазний метод полягає в тому, що окремі компоненти суміші послідовно виділяються з неї, а твердофазний –

в тому, що НК сорбуються на тверду фазу. Найбільш вживаним рідкофазним методом є екстракція фенолом і хлороформом. Фенол відокремлює ДНК від протеїнів, а хлороформ – швидко денатурує протеїни і ліпіди. Крім того, хлороформ разом з ізопропанолом запобігає руйнуванню нуклеїнових кислот і допомагає осадити і виділити РНК. Після змішування гомогенату і фенол-хлороформної суміші роблять центрифугування, яке дає двофазний розчин (верхня фаза – вода з очищеними нуклеїновими кислотами, нижня – інші складові клітини). З верхньої фази продовжують виділення НК. Також важливим є рН розчину, бо воно разом з фенолом може впливати на розподіл ДНК і РНК між собою.

Перед початком виділення НК проводили пробопідготовку:

1. Листя дубу (0,1 г) кладуть у ступку, додають 1,5 мл буферу для лізису (4М гуанідин ізотіоціонат, 30 мМ цитрат натрію, 30 мМ β-меркаптоетанол, рН 7;0–7;5) і товчуть кілька хвилин;
2. Гомогенат, який утворився, переливають у позначені епендорфи об'ємом 1,5 мл і інкубують при 50°C протягом 5 хв, час від часу струшуючи на вортексі;
3. Проводили центрифугування при 10 000 об./хв протягом 3 хв;
4. Супернатант, який потім буде використаний для виділення НК, перекачують у чисті позначені епендорфи.

Фенол-хлороформну екстракцію проводили за наступним протоколом:

1. 300 мкл супернатанту перекачують у чисті епендорфи і додають фенол у тому ж об'ємі, а також 1/5 об'єму суміші хлороформ: ізоаміловий спирт (24: 1);
2. Зразки 4 рази по 1 хв перемішували, тримаючи пробірки на льоду між перемішуваннями;
3. Пробірки центрифугували 5 хв при 13 400 об./хв і переливали 2/3 верхньої фази у чисті епендорфи;

4. Переливали 2 об'єми ізопропанолу, струшували на вортексі і 5 хв центрифугували пробірки при 13 400 об/хв,

5. Одноразовими наконечниками видаляли ізоаміловий спирт і додавали 1 мл 80% етанолу;

6. Пробірки 30 с центрифугували при 13 400 об/хв, одноразовими наконечниками видаляли етанол і осад сушили при кімнатній температурі, доки спирт не випарується повністю (15-20 хв),

7. Осад розчиняли у 100 мкл води, яка не містить рНказ і деіонізована.

Після того, як РНК виділена, роблять зворотну транскрипцію, яка дозволяє синтезувати ДНК з матричної мРНК. Синтез виконують за допомогою зворотної транскрипції – полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) з виявленням результатів у реальному часі, який часто застосовується у молекулярно-генетичних дослідженнях.

Метод ЗТ-ПЛР складається з трьох кроків: синтез кДНК (ДНК, яка відповідає клітинній РНК) за допомогою реакції зворотної транскрипції; підсилення послідовності кДНК, яка відбиває фрагмент гена, що досліджується; аналіз отриманих результатів і встановлення відносної кількості та рівня експресії кДНК досліджуваного гена в зразку. Кількість специфічної кДНК в зразку залежить як від рівня експресії мРНК відповідного гена в клітині, так і від обсягу клітинного матеріалу в зразку, ступеня деградації аналізованої РНК і ефективності реакції зворотної транскрипції.

Дизайн та визначення термодинамічних параметрів олігонуклеотидних праймерів проводили за використання програмного забезпечення Primer3 (Applied Biosystems, США). В якості основних вимог до праймерів були обрані наступні критерії:

- Розмір продукту ампліфікації повинен бути 50-300 п.н.;

- Оптимум температури плавлення (T_m) олігонуклеотидів має бути в межах 58-65 °С;
 - Оптимальний GC склад – в межах 40-60 %;

- Праймери не повинні утворювати стійкі димери, або їх кількість повинна бути якомога меншою;
 - На 3-кінці праймера повинна бути мінімальна кількість C/G нуклеотидів (не більше трьох з п'яти останніх нуклеотидів).

Нуклеотидні послідовності, основні термодинамічні характеристики та очікуваний розмір продукту ампліфікації розроблених нами праймерів представлено в таблиці (Табл. 3.5). Локалізація праймерів на нуклеотидних послідовностях досліджуваних генів представлена на рисунках (Рис. 3.5).

Тестування ефективності ампліфікації, відповідності розміру продуктів ампліфікації досліджуваних генів та оптимізацію умов постановки ПЛР проводили за аналізу геномної ДНК.

Таблиця

Нуклеотидні послідовності розроблених праймерів для визначення рівня експресії генів *Quercus robur*

№ п/п	Назва гену	Сиквенс 5' → 3'	№ Genbank	Розмір продукту, пн	Т відпалу, °С
Референс-гени					
1	Актин	Actin-Tom-F: AACTGGGATGATA TGGAGAAGA Actin-Tom-R: TCTCAACATAAATCT GGGTCAT	BT013524	190	58

2	β-тубулін	β-tubulin-F: AACCTCCATTGAG GAGATGTTT	DQ20534	180	58
		β-tubulin-R: TCTGCTGTAGCATC CTGGTATT			

Досліджувані гени

3	PR-1	PR-1-Tom-F: GGATCGGACAACG TCCTTAC	Y08804	193	58
		PR-1-Tom-R: GCAACATCAAAAAG GGAAATAAT			

4	Фелітала нін амілак- паза	PAL-Tom-F: ACGGGTTGCCATC TAATCTG	M83314	197	58
		PAL-Tom-R: AGCTCTTGTCTGG CTGAAA			

5	Ліпоксиг еназа	LOX-Tom-F: GGCTTGCTTTACTC CTGGTC	U37840	72	58
		LOX-Tom-R: AAATCAAAGCGCC AGTTCTT			

Таблиця
Концентрація та якість робочих розчинів праймерів

Праймер	Концентрація			
	ол ДНК нг/мкл	A260	260/230	260/280
GARDH-Q	60,478	1,8536	1,918	1,814

CHS-Q	60,935	1,8642	1,805	1,897
APX-Q	61,318	1,8581	1,836	1,991
CHI1	60,642	1,8376	1,942	1,974
PAL-Q	60,081	1,8402	1,714	1,834
Kin-Ref-Q	60,382	1,8297	1,538	1,802

В роботі використовували праймери GAPDH-Q, CHS-Q, APX-Q, CHI1, PAL-Q, Kin-Ref-Q (Рис.)

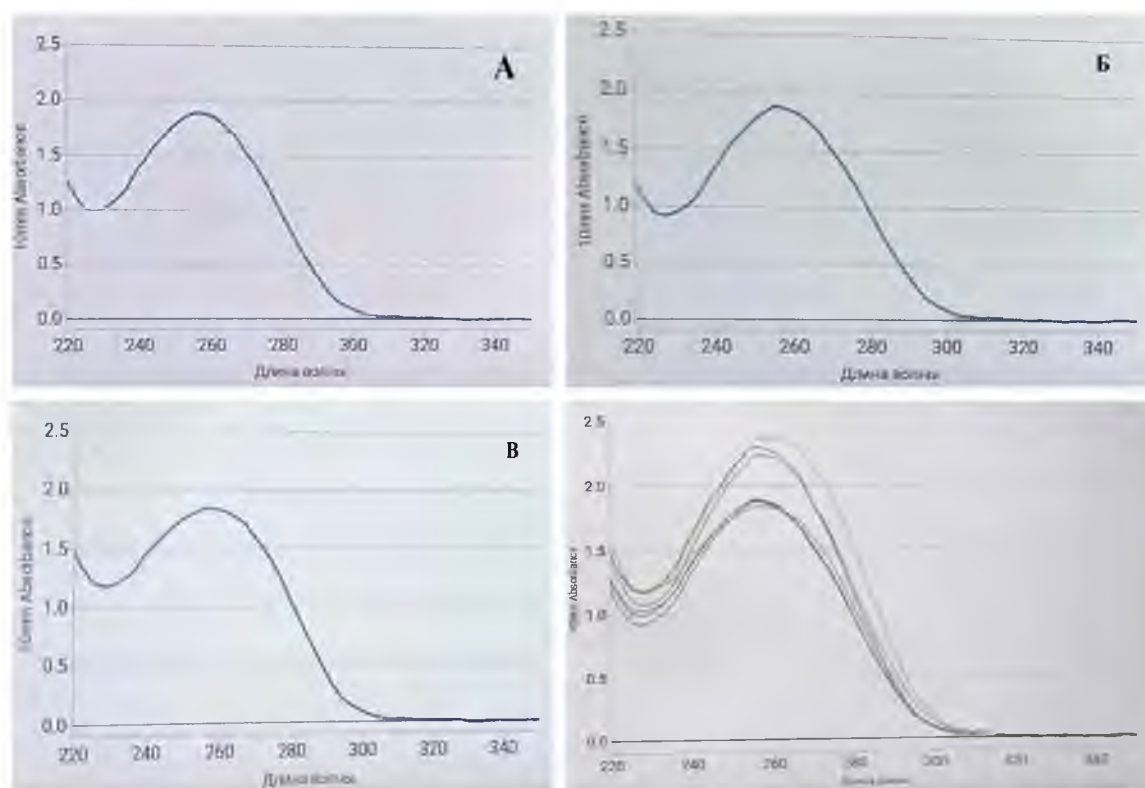


Рис. Спектри поглинання у робочих розчинах праймерів

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ ЕЛІСИТОРІВ НА СИСТЕМУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ В ПАТОСИСТЕМІ QUERCUS ROBUR - ALTERNARIA SPP

3.1 Особливості взаємодії дуба з патогенами Alternaria spp.

Антифунгальна активність досліджуваних штамів. Як видно з табл. ,

штами бактерій *B. halotolerans* BHFHB та *B.subtilis* BSFHB виявили здатність

суттєво пригнічувати ріст фітопатогенних мікроміцетів *Alternaria alternata*

AAFHB/

Зона затримки росту міцелію *Alternaria alternata* AAFHB за дії

екзометаболітів штаму *B.subtilis* BSFHB коливалась від 10,7 до 16,3 мм, що

майже 1,4 рази перевищувало відповідний показник у контролі. Зона затримки

росту міцелію для штаму *B. halotolerans* BHFHB, коливалась від 15,5 до 18,2

мм в залежності від виду гриба. Протягом 4-6 діб під дією екзометаболітів

бактерій колонії грибів набували еліпсоподібної форми.

Таблиця . Вплив рістстимулювальних бактерій на показники лінійного росту

(мм) *A. alternata* ($\bar{x} \pm SE, n = 4$)

Фітопатогени	PGPB	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁ /R _{av}	ЗІР
<i>Alternaria alternata</i> AAFHB	<i>B.subtilis</i> BSFHB	12,5 ± 0,47	8,6 ± 0,53	10,9 ± 0,61	1,7 ± 0,56	1,3 ± 0,08	5,1 ± 0,48
	<i>B. halotolerans</i> BHFHB	16,2 ± 1,23	10,2 ± 0,39	11,4 ± 0,24	10,4 ± 0,40	2,5 ± 0,16	13,2 ± 0,36
	Контроль	20,6 ± 0,85	21,0 ± 0,49	18,7 ± 0,20	17,4 ± 0,74	1,0 ± 0,03	-



Рис. Проявлення антифунгальної дії бактерій роду *Bacillus* до *Alternaria alternata*

3.2 Вплив ендоефітних бактерій роду *Bacillus* на реакції саджанці дуба за ураження грибами роду *Alternaria* spp.

За польових тестувань на однорічних сіянцях *Q. robur* встановлено, що за інкуляції патогенними грибами утворились уражені ділянки світлого кольору, велика зона некрозу. За інкуляції ізольованими ендоефітними бактеріями, ознаки ураження були відсутні, або виявились незначними.

Відомо, що біоактивні сполуки, які утворюють корисні ендоефітні бактерії, стимулюють ріст коренів, збільшують загальну площу їхньої поверхні, що сприяє живленню рослин і підвищенню життєздатності в стресових умовах (рис.).

НУЕ



И

НУЕ

И

НУЕ



И

НУЕ



И

НУБІГ У КРАЇНИ

Рів. Листів № 54

НУБІГ У КРАЇНИ

НУБІГ У КРАЇНИ

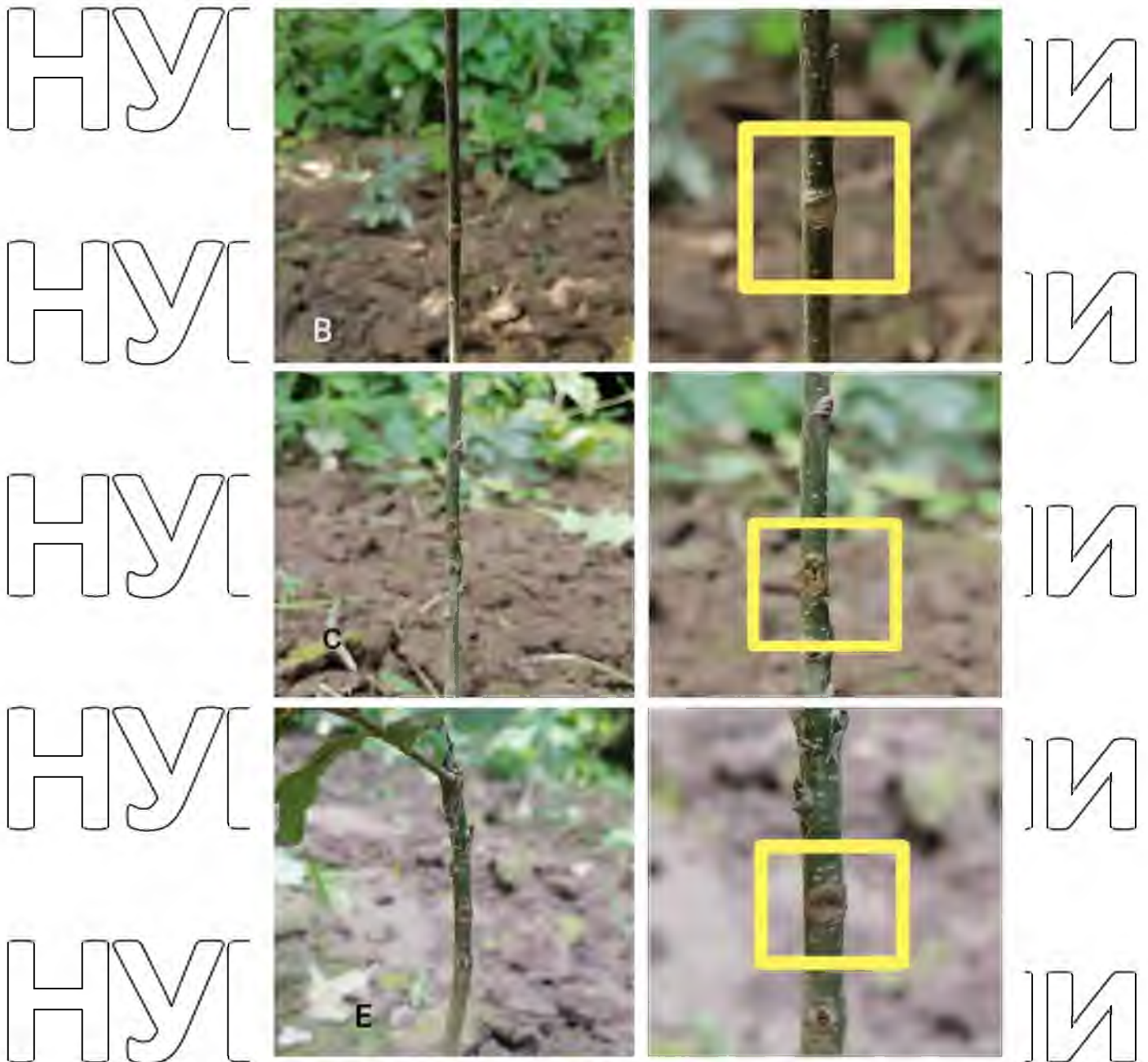


Рис. Пагони дуба після зараження й інюкуляції: В, С, Е.

Примітка: В – контрольні сіянці з пошкодженнями; С – сіянці, що зараженні *Alternaria alternata*; Е – сіянці, що зараженні *Alternaria alternata* та одночасно інюкульовані ендосфитними бактеріями роду *Bacillus*;

За дії ендосфитних бактерій, спостерігали також більш швидку регенерацію тканин стебел сіянців. За ураження *A. alternata*, спостерігали типові симптоми ураження тканин.

НУБІП України

3.4 Вплив еліситорів на регенерацію тканин: особливості формування тканин

3.5 Вплив еліситорів на біохімічний статус рослин

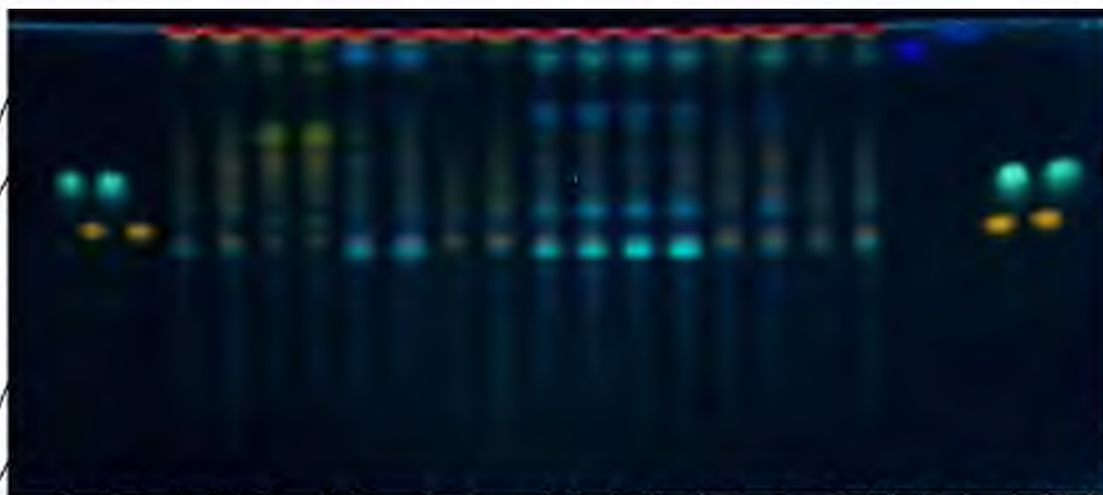


Рис. Хроматограма тонкошарова

Під впливом комплексу ендofітних бактерій у біохімічних профілях листків дуба були певні відмінності в накопиченні окремих сполук. Так, у рослин зросла кількість речовини з $R_f \sim 0,27$, $0,62$ та $0,88$. Однак, вміст хлорогенової кислоти $R_f \sim 0,47$ трохи знижувався.

У рослин була інша відмінність у накопиченні відповідних фенолів. У цьому порівняно з контролем концентрація всіх фенольних сполук знижувалась. Вміст хлорогенової кислоти зменшився у 2 рази. Вміст речовин з $R_f \sim 0,27$, $0,62$ та $0,88$ знизився у 1,06 раз відповідно.

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ЕЛІСІТОРІВ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ В ПАТОСИСТЕМІ QUERCUS ROBUR - ALTERNARIA SPP

4.1. Оптимізація умов проведення ПЛР у реальному часі

Таблиця. Концентрація та якість зразків кДНК

Зразок	Концентрація			
	дл ДНК нг/мкл	A260	260/230	260/280
Контроль	86,154	1,7231	2,022	1,921
Заражений <i>Alternaria</i> <i>alternata</i>	111,186	2,2237	1,960	1,876
Інокульований <i>Bacillus</i>	101,638	2,0328	2,050	1,894
<i>Alternaria</i> <i>Bacillus</i>	106,591	2,1318	2,100	1,894

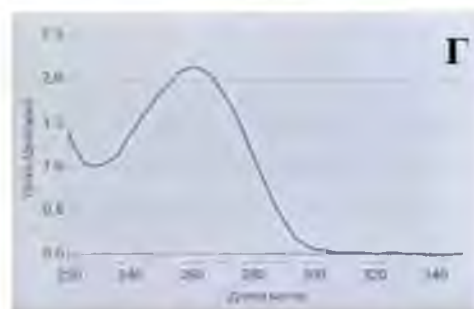
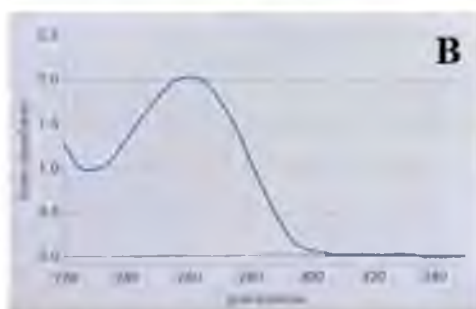
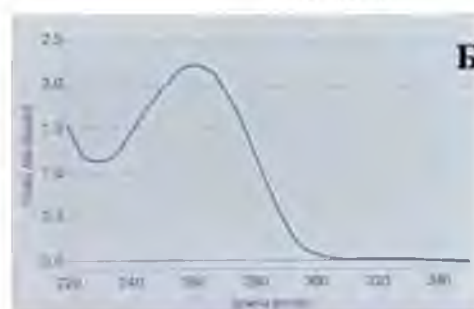
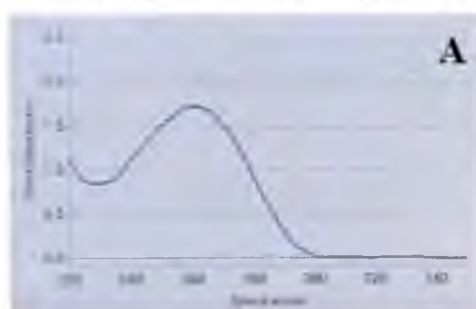


Рис. Спектри поглинання у зразках кДНК: А, Б, В, Г.

Примітка: А – контроль; Б – заражений *Alternaria alternata*; В – інокульований *Bacillus*; Г – заражений *Alternaria alternata* й інокульований *Bacillus* одночасно.

4.2. Аналіз експресії генів патоген-залежних (PR) білків саджанців дуба

Метод ПЛР у реальному часі (Real-Time PCR) є одним з найпопулярніших методів аналізу. При його застосуванні необхідно дотримуватись чіткого протоколу. Але для правильного і ефективного проведення ПЛР потрібно підібрати оптимальні умови, а саме: склад реакційної суміші, співвідношення та концентрацію реактивів, температуру ампліфікації, кількість та тривалість циклів. Одними з важливих чинників є саме концентрація ДНК-матриці у суміші, концентрація праймерів та температура відпау під час ампліфікації.

Для кількісного визначення мРНК у зразках рослинних тканин потрібно, щоб ампліфікація порівнюваних фрагментів була однаково ефективною

(Е). Абсолютне визначення транскриптів ґрунтується на порівнянні експериментального зразка зі стандартом, якщо відома кількість копій кДНК в одиниці об'єму.

Цей підхід є правильним, якщо в експерименті використовуються кілька стандартних зразків з різною концентрацією цільової матриці кДНК. Це дозволяє побудувати калібрувальну криву відповідності порогового значення флуоресценції (C_p) ступеню розведення матриці: значення C_p експериментальних зразків порівнюються з C_p , отриманими в серії стандартних зразків з відомою концентрацією цільових матриць. У такому випадку результати визначаються як кількість копій кДНК на одиницю маси.

У цій роботі умови було оптимізовано підбором концентрації праймерів генів патоген-залежних (PR1) білків дуба. Для ЦПР було зроблено 3 реакційні суміші з різними концентраціями праймерів: 1 – без розведення (концентрацією 5 мкмоль/мл), 2 – розведення в 1,5 рази (концентрацією 3,3 мкмоль/мл), 3 – розведення в 2 рази (концентрацією 2,5 мкмоль/мл).

Результати підбора концентрації праймерів до гену патоген-залежного білка показали, що зменшення їхньої кількості у 1,5 рази призводить до зростання показника порогового значення сигналу флуоресценції C_q більше ніж на одиницю. Це може означати, що кількість праймерів для гену PR1 є недостатньою для того, щоб задіяти всі копії ДНК в реакційній суміші. На це вказує і той факт, що подальше зменшення концентрації праймерів викликало закономірне зниження ефективності

ЦПР

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

НУБІП України

1. За допомогою сучасних методів досліджень, таких як, хроматографія та ПЛР у реальному часі було проведено дослідження, метою якого було оцінити вплив ендofітних бактерій роду *Bacillus* на генетичну детермінацію факторів резистентності в пагоcистемі *Quercus robur* - *Alternaria* spp.

НУБІП України

2. Після хроматографії та спектрофотометрії було встановлено якість та кількість вторинних метаболітів у листках досліджених рослин. Їх вміст значно різнився між дослідними та контрольними зразками, а саме було

НУБІП України

спостережено, що синтез більшості вторинних метаболітів рослиною після інокуляції ендofітами зменшувався у 1,1-1,3 рази.

НУБІП України

3. Після ПЛР у реальному часі, було виміряно експресію ключових генів, які включаються при проникненні в рослинний організм патогенних мікроорганізмів. Таким чином, активність генів PR-1 білків та ліпоксигенази була значно меншою для дослідів порівняно з контролем.

НУБІП України

4. Таким чином, візуальний та молекулярно-генетичний аналіз дослідного та контрольного зразків показали, що ендofітні бактерії роду *Bacillus*, які співживають з рослиною, можуть виробляти багато біологічно активних речовин, які пригнічують синтез рослинних метаболітів і покращують системну стійкість рослин проти патогенних грибових мікроорганізмів. Тому, потрібне подальше дослідження цих ендofітів та їх взаємодії з цінними сільськогосподарськими культурами.

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Імунітет рослин: Підручник / М.Д. Євтушенко, М.П. Лісовий, В.К. Пантелеєв, О.М. Слюсаренко (за ред. М.П. Лісового). — К.: Колодін, 2004. — 304 с.
2. Robinson, R.A., 1987. Host management in crop pathosystems, Biological Resource Management. Macmillan [u.a.], New York.
3. Tsedaley, B., 2014. Review On Early Blight (*Alternaria* spp.) of Potato Disease and its Management Options. *J. Biol. Agric. Health*.
4. Wharton, P., Kirk, W., 2012. Early Blight. Potato Disease, Michigan State University.
5. Перепелиця, Л.О., Корево, Н.І., Гуторчук, С.Л., 2023. Словник-довідник з фітопатології для підготовки фахівців першого (бакалаврського) рівня вищої освіти.
6. Гвоздяк Р.І. та ін. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин; за ред. В.П. Патики. К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. Т.1. 444 с.
7. Bonan, G.B. Forests and climate change: Forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science* 2008, 320, 1444–1449.
8. Shvidenko, A.; Buksha, I.; Krakovska, S.; Lakyda, P. Vulnerability of Ukrainian forests to climate change. *Sustainability* 2017, 9, 1152.
9. Seidl, R.; Thom, D.; Kautz, M.; Martin-Benito, D.; Peltoniemi, M.; Vacchiano, G.; Wild, J.; Ascoli, D.; Petr, M.; Honkaniemi, J.; et al. Forest disturbances under climate change. *Nat. Clim. Chang.* 2017, 7, 395–402.
10. Leach, J.E.; Triplett, L.R.; Argueso, S.T.; Trivedi, P. Communication in the phytobiome. *Cell* 2017, 169, 587–596.
11. Gupta, A.; Mishra, R.; Rai, S.; Bano, A.; Pathak, N.; Fujita, M.; Kumar, M.; Hasanuzzaman, M. Mechanistic Insights of Plant Growth

Promoting Bacteria Mediated Drought and Salt Stress Tolerance in Plants for Sustainable Agriculture. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3741.

12. Smith, S.A.; Tank, D.C.; Boulanger, L.A.; Bascom-Slack, C.A.; Eisenman, K.; Kingery, D.; Babbs, B.; Fenn, K.; Greene, J.S.; Hann, B.D.; et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PLoS ONE* 2008, 3, e3052.

13. Frank, A.C.; Saldriana Guzman, J.P.; Shay, T.E. Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* 2017, 10, 70.

14. Nguyen, M.H.; Yong, J.H.; Sung, H.J.; Lee, J.K. Screening of Endophytic Fungal Isolates Against *Raffaelea quercus-mongolicae* Causing Oak Wilt Disease in Korea. *Mycobiology* 2020, 48, 484–494.

15. Yang, A.; Juzwik, J. Use of nested and real-time PCR for the detection of *Ceratocystis fagacearum* in the sapwood of diseased Oak species in Minnesota. *Plant Dis.* 2017, 101, 480–486.

16. Tashi-Oshnoei, F.; Harighi, B.; Abdollahzadeh, J. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol potential from oak trees. *For. Pathol.* 2017, 47, e12360.

17. Brooks, D.S.; Gonzales, C.F.; Appel, D.N.; Filer, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biol. Control* 1994, 4, 373–381.

18. Болтенков Ю. О., Стовбуненко Д. В. Випробування фунгіцидів для захисту молодих культур дуба від ураження збудником борошнистої роси. Лісівництво і агролісомеліорація. Харків, 2008. Вип. 112. С. 238–240

19. Грицаєнко З. М., Пономаренко С. П., Карпенко В. П., Леонтюк І. Б. Біологічно активні речовини в рослинництві. К., ЗАТ "НІЧЛАВА", 2008. 352 с.

20. Чернявський М. В. Природоохоронне лісівництво у дубових лісах Лісостепу. Лісове господарство, лісова, паперова, і деревообробна промисловість. 2006. Вип. 30. С. 178–187

21. Thomma, B. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4: 225-236
22. Devendra K. Choudhary, Anil Prakash & B. N. Johri; Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action; *Indian Journal of Microbiology* volume 47, pages 289–297 (2007)
23. Spoel SH, Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jan 25;12(2):89-100.
24. Ramyabharathi, S.A.; Meena, B.; Raguchander, T. Induction of chitinase and β -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis*/EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *JTBSRR* 2012, 1, 50–60.
25. Thevissen K, Ferket KKA, François IEJA, Cammue BPA. Interaction of antifungal plant defensins with fungal membrane components// *Peptides*. – 2003. – 24. – P. 705-712.
26. Пінчук Н.В., Вергелес П.М., Коваленко Т.М., Окрушко С.Є. Загальна фітопатологія: Навч. посіб. / За ред. Н.В. Пінчук. – Вінниця, 2018. – 272 с.
27. Kowalski, T. (1996). Oak decline II. Fungi associated with various types of lesions on stems and branches of young oaks (*Quercus robur*). *Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde*, 5, 51–63
28. Simmons, E. G. 2007. *Alternaria: an identification manual*. CBS biodiversity series 6. Utrecht, The Netherlands
29. Bilous, S., Likhanov, A., Boroday, V., Marchuk, Y., Zelena, L., Subin, O., & Bilous, A. (2023). Antifungal Activity and Effect of Plant-Associated Bacteria on Phenolic Synthesis of *Quercus robur* L. *Plants*, 12(6), 1352.
30. Hlaiem, S., Yangui, I., Khadraoui, H., Ezzine, O., Lahbib, M., & Jamaa, B. (2023). First report of *Alternaria* sp. associated with branch canker of *Quercus coccifera* L. in Tunisia. *IOBC-WPRS Bulletin*, 168, 147-150.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України