

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

СУБІН ОЛЕКСАНДР ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 632.1/.8:634.75-026.564

**ІНДУКОВАНА СТІЙКІСТЬ
СУНИЦІ САДОВОЇ (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.)
ПРОТИ ОСНОВНИХ ФІТОПАТОГЕНІВ**

06.01.11 «Фітопатологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Роботу виконано у Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор біологічних наук,
професор, академік НААН
Мельничук Максим Дмитрович,
Навчально-науково-виробничий комплекс
«Всеукраїнський науково-навчальний консорціум»,
віце-президент з наукової, інноваційної
та міжнародної діяльності

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Бабаянц Ольга Вадимівна,
Селекційно-генетичний інститут –
Національний центр насіннєзнавства
та сортовивчення НААН,
завідувач відділу фітопатології та ентомології

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Курченко Ірина Миколаївна,
Інститут мікробіології і вірусології
імені Д. К. Заболотного НАН України,
завідувач відділу фізіології
та систематики мікроміцетів

Захист відбудеться «28» квітня 2021 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.02 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «26» березня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. О. Сикало

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Підвищення рівня виробництва та якості готової рослинної продукції в сучасних екологічних умовах потребує розроблення нових альтернативних способів захисту рослин внаслідок індукованої стійкості до фітопатогенів із максимальним використанням адаптивних можливостей самих рослин. Одним із таких підходів є стимулювання власної стійкості рослин за впливу певних індукторів або елісаторів, які запускають захисні реакції, зокрема, проти біотичних стресових чинників середовища (Жук, Дмитрієв, 2015; Amiri et al., 2020; Jamiolkowska, 2020; Moreno-Perez et al., 2020).

Стійкість рослин до патогенів ґрунтується на складній мережі конститутивних та індукованих захисних бар'єрів, у контролі яких задіяна велика кількість генів (Смирнова, Кочетов, 2015). Однією з характерних реакцій клітини на зараження є так званий окиснювальний вибух – утворення активних форм кисню (Минибаєва, Гордон, 2003; Daudi et al., 2012; Del Rio, Lopez-Huertas, 2016; Leister, 2017; Waszczak et al., 2018). Швидке утворення активних форм кисню, що пов'язане з окиснювальним вибухом, і є однією з найбільш ранніх реакцій рослинних клітин, яким передують утворення хімічних сигнальних молекул – елісаторів, що відіграють роль первинних сигналів і запускають процеси індукції і регуляції фітоімунітету (Hahn, 1996; Doughari, 2015). Серед них велику увагу привертають біогенні елісатори, зокрема, олігосахариди (хітин, хітозан, глюкан та їх олігомери) (Озерецковская, 1994; Doares et al., 1995; Gallego-Giraldo, 2018), стресові фітогормони, саліцилова і жасмонова кислоти (Шакирова, 2001; Дмитриев, 2002; Тютєрев, 2002; Patel et al., 2020). Питання взаємодій у системах елісатор – рослина, елісатор – патоген, елісатор – рослина – патоген залишається до кінця нерозкритим. Дослідження механізмів захисної дії вторинних метаболітів при контакті з патогеном дозволить розробити ефективні стратегії захисту рослин через запуск реакцій відповіді та формування системної набутої стійкості рослинних організмів проти фітопатогенів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано на базі навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії Національного університету біоресурсів і природокористування України в рамках науково-технічних програм за темами «Генетична паспортизація і технологія мікроклонального розмноження та оздоровлення високопродуктивних сортів ягідних культур» (номер державної реєстрації 0115U003377, 2015–2016 рр.) та «Дослідження механізмів адаптогенної дії хітозан-меланінового комплексу на рослинно-мікробні системи» (номер державної реєстрації 0117U002540, 2017–2019 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – дослідити реакції модельних рослин за впливу елісаторів і з'ясувати їхню роль у формуванні системи індукованої стійкості суниці садової проти основних фітопатогенів.

Для вирішення поставленої мети було вирішено такі завдання:

– оптимізувати методику мікроклонального розмноження та умови культивування модельних рослин для дослідження реакцій індукованої стійкості;

- проаналізувати вплив екзогенної саліцилової кислоти на морфогенез та антиоксидантний потенціал модельних культур в умовах *in vitro*;
- дослідити ефективність застосування біопрепаратів в процесі адаптації *ex vitro* за умов зараження мікроміцетами роду *Rhizoctonia* spp.;
- визначити ключові фізико-хімічні параметри підібраних форм хітозанів різного біологічного походження;
- дослідити активність генів, що кодують PR-білки модельних рослин за впливу на них хітозанів різного біологічного походження;
- встановити якісний склад, визначити динаміку акумуляції фенольних сполук і специфіку реакцій відповіді модельних рослин за дії розчинів хітозанів різного біологічного походження;
- провести порівняльний аналіз видового складу мікобіоти філоплани, ризоплани та ризосфери за обробки модельних рослин розчинами хітозанів;
- визначити ефективність комплексів хітозан – сорбінова кислота проти фітопатогенних мікроорганізмів.

Об'єкт дослідження – реакції індукованої стійкості модельних рослин.

Предмет дослідження – вплив еліситорів на трансформацію метаболізму модельних рослин, яка пов'язана з індукованою стійкістю проти фітопатогенів.

Методи дослідження: фізико-хімічні (визначення ступеня деацетилювання і молекулярної маси хітозанів різного біологічного походження); молекулярно-генетичні (виділення РНК/ДНК, полімеразної ланцюгової реакції та полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот у агарозному гелі); хроматографічні (якісний і кількісний склад вторинних метаболітів за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії, тонкошарової хроматографії, вискоефективної тонкошарової хроматографії; визначення моносахаридного складу хітозанів); біотехнологічні (культивування в культурі *in vitro* модельних культур); мікробіологічні (культивування мікроорганізмів); спектрофотометричні (визначення кількісного складу вторинних метаболітів фенольної природи, їх антиоксидантної активності та ферментів оксидативного стресу); біохімічні; специфічне біотестування на гіберелову активність; статистичні (мультирегресійний, кореляційний і кластерний аналізи даних).

Наукова новизна одержаних результатів. Основні положення дисертації, що визначають її наукову новизну полягають у тому, що *вперше*:

- виявлено значні відмінності захисних реакцій рослин за синтезом фенольних сполук у тканинах листків залежно від біологічного походження хітозану, його молекулярної маси і ступеня деацетилювання; з'ясовано, що низькомолекулярний хітозан грибного походження сприяє мобілізації рослинного організму проти потенційних фітопатогенів через збільшення вмісту фенолів і підвищення загального антиоксидантного потенціалу;
- встановлено, що індукована через саліцилатний шлях системна стійкість модельних рослин супроводжується активним синтезом хлорогенової кислоти та інших кон'югатів оксикоричних кислот з високим антиоксидантним потенціалом і властивостями неспецифічних регуляторів росту; додавання саліцилової кислоти у живильне середовище (25 мг/л) стимулює гемогенез

у рослин суниці садової *in vitro*, який відбувається на фоні посилення оберненої залежності ($r=-0,90$) між показниками площі листків і вмістом у тканинах флавоноїдів;

– експериментально доведено, що комплексні біопрепарати Триходермін (8,0 мл/л), Фітоцид (1,0 мл/л), Планриз (35,0 мл/л) підвищують стійкість рослин суниці садової до ураження збудником чорної кореневої гнилі;

– на основі аналізу депонованих у GenBank нуклеотидних послідовностей розроблено специфічні праймери для ампліфікації ділянок екзонів чотирьох генів PR-білків суниці садової: PR-1, PR-2a (β -1,3-глюканаза), PR-2b (ендо- β -1,4-глюканаза) і PR-3 (хітиназа); встановлено, що відносний рівень експресії цих генів після обробки рослин низькомолекулярним хітозаном (виділеного з плодів печериць) був вищим порівняно з високомолекулярним хітозаном (тваринного походження);

– з'ясовано, що у відповідь на обробку рослин суниці садової низько- і високомолекулярним хітозаном в асиміляційних органах підвищується вміст 2,3-S-гексагідроксидифеніл-D-глюкози. Показано особливості накопичення елагової кислоти як одного із ключових компонентів захисних реакцій рослин проти збудників хвороб;

– доведено, що комплекс хітозану з сорбіновою кислотою має пролонговану антибактеріальну дію щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* і *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* та антифунгальну дію щодо видів родів *Fusarium* і *Alternaria*.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами досліджень вперше розроблено і впроваджено технологію клонального мікророзмноження *in vitro* і промислове виробництво ягоди суниці садової сорту «Аліна» на базі СТОВ «Світанок» (Київська область). Методом ферментативного гідролізу плодів *Agaricus bisporus* вперше отримано і досліджено склад моноцукрів хітозану, що має вагомий практичний значення для дослідження системного захисту рослин різних видів.

Отримані науково-практичні результати впроваджено в навчальний процес і видано науково-методичні рекомендації «Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин» для викладання дисципліни «Інструментальні методи аналізу» для ОС «Магістр» спеціальності «Екологічна біотехнологія та біоінженерія» на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Особистий внесок здобувача. Основна частина наукових положень дисертації належить особисто здобувачу та є його науковим доробком. Стратегічні планування експериментів, проведення ряду досліджень та інтерпретацію отриманих результатів проведено за безпосередньої участі наукового керівника доктора біологічних наук, професора, академіка НААН М. Д. Мельничука. Частина досліджень проведено у співпраці з А. Ф. Ліхановим, О. Л. Кляченко, В. В. Бородай, Н. М. Волощук, О. В. Дубіним, О. В. Середою та В. Г. Спиридоновим, що підтверджують спільні наукові праці та посилання в тексті дисертації. Здобувачем

сформульовано мету та завдання дисертації, проведено пошук літературних даних, підбір методів, виконано основні експериментальні дослідження, а також аналіз й узагальнення результатів досліджень.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати дисертації було представлено на: IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, 2015 р.); VIII Міжнародній конференції «Регуляція росту, розвитку и продуктивности растений» (м. Мінськ, Республіка Білорусь, 2015 р.); IV Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 2016 р.); IV Міжнародній науковій конференції молодих дослідників «Biotechnology. Science and Practice» (м. Єреван, Вірменія, 2017 р.); II Міжнародній конференції «Smart Bio» (м. Каунас, Литовська Республіка, 2018).

Публікації. Основні результати дисертації представлено в 15 наукових працях, з яких монографія, 5 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у наукових виданнях інших держав, включених до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, стаття в іншому науковому виданні України, науково-методичні рекомендації, 5 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій, переліку умовних позначень, вступу, семи розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 205 сторінках, основна її частина містить 29 таблиць та 54 рисунки. Список використаних джерел налічує 339 найменувань, з них 245 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1 «Огляд літератури». Проаналізовано роль вторинних метаболітів фенольної природи в адаптивних системах рослин до стресів різної етіології. Узагальнено літературні дані щодо стійкості рослин проти основних фітопатогенів. Розглянуто роль еліситорів в системній набутій стійкості рослин. Проведено аналіз публікацій біоцидної та еліситорної активності хітозану залежно від його біологічних і фізико-хімічних властивостей.

Розділ 2 «Матеріали і методи дослідження». Як модельні культури використовували рослини *Nicotiana tabacum* L. і *Fragaria ananassa* Duch., які було отримано за допомогою мікроклонального розмноження та адаптовано до умов *ex vitro*. Після адаптації рослини вирощували на торф'яних субстратах за сталої температури (25 °C) і фотоперіоду (16 год).

Визначення експресії PR-білків, захисних реакцій, динаміки фенольних сполук, динаміки видового складу філоплани, ризоплани і ризосфери проводили за обробки модельних рослин 0,4 % розчинами низькомолекулярного і високомолекулярного хітозанів. Хітозан розчиняли в 0,05 н соляній кислоті і доводили рН до 5,6 за допомогою 0,1 н гідроксиду натрію. Відбір зразків проводили до обробки та через 1, 12, 24, 48, 72 год після обробки рослин розчинами хітозану.

Полімеразну ланцюгову реакцію в режимі реального часу проводили на ампліфікаторі CFX96 (BioRad, США) за допомогою Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) у наступному температурному режимі: 10 хв за 95 °С; 42 цикли: 20 с за 95 °С, 20 с за 60 °С (зняття сигналу), 30 с за 72 °С. Реакційна суміш на один зразок загальним об'ємом 20 мкл містила: 10 мкл 2х мастер мікса, 200 нг кДНК, 0,3–0,5 мкМ прямого та зворотного праймерів. Відносний рівень експресії досліджених генів (RQ) розраховували за $2^{-\Delta\Delta C_t}$ методом (Livak et al., 2001).

Сумарне визначення фенольних сполук проводили методом спектрофотометрії з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу за Singleton і Rossi (Singleton, Rossi, 1965). Антиоксидантну активність фенольних сполук визначали модифікованим методом Блуа (Brand-Williams et al., 1995). Вміст флавоноїдів визначали за допомогою спектрофотометрії через утворення стабільних комплексів з хлоридом алюмінію за $\lambda=419$ нм у 4-разовій повторності (Беликов, Шрайбер, 1970).

Якісний склад біохімічних сполук у листках суниці садової визначали методом високоефективної тонкошарової хроматографії на пластинках Merck (Silica gel 60) у системі розчинників хлороформ – оцтова кислота – метанол – вода (v/v v/v–60/32/12/8) з подальшою обробкою анісовим альдегідом і наступним нагріванням (5 хв за 105 °С). Хроматографічне розділення рослинних екстрактів проводили на рідинному хроматографі Agilent 1260 Infinity (Німеччина), обладнаному діодно-матричним детектором поглинання (DAD) за наступних умов: колонка Agilent Zorbax SB-C18, 250 × 4.6 мм, розмір частинок 5 мкм (США), температура колонки – 25 °С. Рухома фаза складалася з ацетонітрилу (А) фосфорної кислоти розведеної водою (В) (0,5:99,5) (v/v) за швидкістю потоку 1 мл/хв. Ультрафіолетові спектри фенольних сполук вимірювали в діапазоні 200–450 нм, ультрафіолетовий слід – при 254 нм. Елагову кислоту та рутин використовували як зовнішній стандарт для кількісного визначення фенольних сполук.

Мікобіоту модельних культур вивчали з використанням загально прийнятих у мікології методів (Билай и др., 1982). Дослідження морфологічних структур виділених видів грибів здійснювали методом світлової мікроскопії, для чого виготовляли тимчасові препарати. Для ідентифікації мікроміцетів використовували визначники вітчизняних та іноземних авторів (Леонтьев, 2008; Коваль та ін., 2014; Nayak, 2015). Ізоляти збудників бактеріозів і мікозів плодовоовочевої продукції (PP-43, PSP-31, PP-43) було виділено з уражених зразків різних рослин і досліджено згідно з загальновизнаними в бактеріології і мікології методами (Бельтюкова та ін., 1968; Герхард та ін., 1983; Попкова, Шмыгля, 1987; Билай и др., 1988). Також використано штами бактерій *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 8982 та *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) 7750 з колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України. Виділені ізоляти мікроміцетів було ідентифіковано як збудники мікозів (види родів *Fusarium* і *Alternaria*). Визначення антимікробної дії досліджуваних речовин проводили модифікованим експрес-методом лунок (Билай, 1982; Патица та ін., 2017).

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою програмного забезпечення Image Pro Premier, Statistica 7, Sigma Plot 12, ExcelSTAT. Результати досліджень представлено як $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартна похибка.

Розділ 3 «Вплив саліцилової кислоти і комплексних біопрепаратів на фенольний синтез та стійкість модельних культур проти збудника чорної кореневої гнилі». Оскільки в природних умовах рослини постійно зазнають абіотичних і біотичних стресів, дослідження захисних механізмів та адаптивних реакцій складні для інтерпретації. У зв'язку з цим, доцільно використовувати генетично однорідні, вільні від ендofітних і патогенних мікроорганізмів модельні культури, які отримано в культурі *in vitro* та вирощено в сталих умовах, що дозволяє нівелювати дію на рослини невизначених чинників. Як модельні рослини використовували тютюн звичайний (*Nicotiana tabacum* L.) і суницю садову (*Fragaria ananassa* Duch.). Для оптимізації методики мікроклонального розмноження модельних рослин досліджено вплив різних регуляторів росту на процеси росту експлантатів *in vitro*. Використано шість варіантів модифікованого живильного середовища Мурасіге-Скуга (MS) з різними концентраціями і співвідношеннями фітогормонів, а також з додаванням саліцилової кислоти (СК), що є індуктором стійкості у рослин. Експериментально встановлено, що додавання саліцилової кислоти в живильне середовище у концентрації 25 мг/мл значно прискорює процеси пагоноутворення. Порівняно з контролем у сортах Голосіївська рання і Аліна виявляється інтенсивна мультиплікація пагонів у розетці і достовірно збільшується загальна площа листків.

Методом тонкошарової хроматографії виявлено індивідуальні сполуки, які синтезуються лише в контрольній (K_2 , $R_f \sim 0,69$) та експериментальній групах рослин ($СК_2$, $R_f \sim 0,64$; $СК_3$, $R_f \sim 0,89$). Стимулююча дія $СК_2$ була порівняна з дією гіберелової кислоти (ГК). За додавання до розчину сахарози одначано $СК_2$ і ГК (10 мкг/мл) спостерігали гальмування ростових процесів. Аналогічний результат було отримано за сумісної дії на колеоптилі K_2 і ГК. Виражену гальмуючу дію виявила фенольна сполука $СК_3$, яку було виділено з метанольних екстрактів досліджених сортів суниці садової. Тест на розтягування колептилів пшениці виявив здатність цієї сполуки гальмувати процес майже на 50 % порівняно з контролем (рис. 1).

Це свідчить, що саліцилова кислоти спричиняє зміни у вторинному метаболізмі, які супроводжуються синтезом біологічно активних сполук з властивостями регуляторів росту. Встановлено, що додавання саліцилової кислоти до базових живильних середовищ стимулює синтез хлорогенової кислоти, її ізомерів та інших кон'югатів оксикоричних кислот. Всього методом високоефективної тонкошарової хроматографії виявлено шість індивідуальних сполук з яскравою блакитною флуоресценцією під ультрафіолетовим світлом (365 нм). Індуковане підвищення концентрації хлорогенової кислоти ($R_f \sim 0,53$) та іншого кон'югату оксикоричної кислоти ($R_f \sim 0,61$) в тканинах листків мало сортові відмінності і коливалося в межах 1,1–3,7 раза. За рівнем індукованого підвищення концентрації цієї сполуки у порядку зростання досліджені сорти

мають наступний ряд: Берегиня (у 1,07 раза) < Факел (1,57) < Дашенька київська (1,21) < Голосіївська рання (1,64) < Аліна (2,28 раза). Збільшення концентрації хлорогенової кислоти та інших похідних коричних і оксикоричних кислот, похідних флорогюцину і фенілетанолу у тканинах листків суниці садової за впливу екзогенної саліцилової кислоти є фактом індукованої перебудови фенілпропаноїдного синтезу, що суттєво впливає на фізіологічний стан рослин, прискорює процеси органогенезу у регенерантів в умовах *in vitro*, що є важливим показником стійкості рослин.

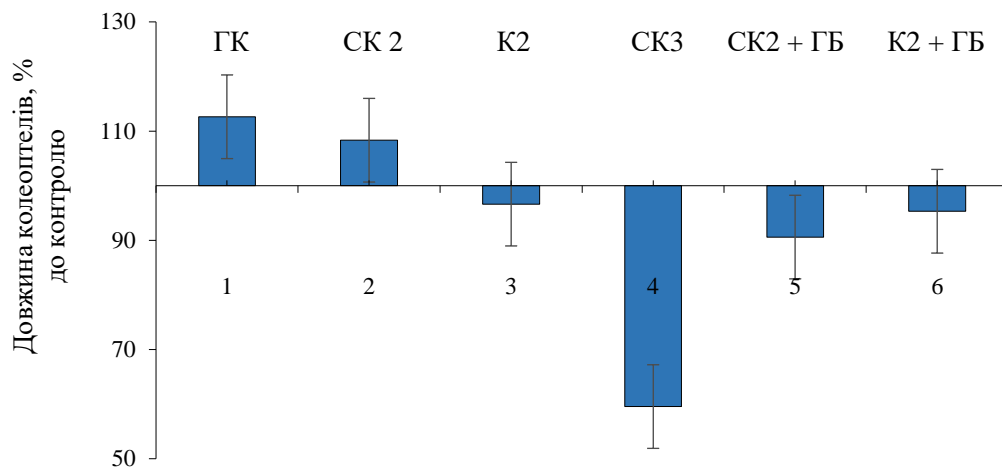


Рис. 1. Оцінка впливу біологічно активних сполук на процеси розтягування клітин колеоптилів пшениці: ГК – гіберелін; K₂ (Rf ~ 0,69); СК₂ (Rf ~ 0,64); СК₃ – речовина (Rf ~ 0,89)

Під час штучного зараження стерильного субстрату, на якому проходили адаптацію модельні рослини *F. ananassa*, фітопатогенами роду *Rhizoctonia* spp. було встановлено, що за додавання біопрепаратів на коренях рослин утворювалися бурі плями, а у контролі – побуріння тканин з виразками (табл. 1).

Таблиця 1

**Біологічна ефективність біопрепаратів
щодо збудника чорної кореневої гнилі суниці садової через 4 тижні**

Препарат	Норма внесення препарату, мл/л	Кількість здорових рослин, %	Ступінь ураження кореневої системи, %	Біологічна ефективність, %
Контроль	—	65,3	21,3	—
Фітоцид	1,0	78,6	7,5	67,2
Планриз	35,0	75,4	10,2	62,3
ФітоХелп	1,5	72,4	12,4	57,7
Триходермін	8,0	82,3	6,8	72,9
<i>HIP₀₅</i>		2,31	1,14	

Найвищу біологічну ефективність проти *Rhizoctonia* spp. мав біопрепарат Триходермін (*Trichoderma* spp.) – 72,9 %. Загалом інші біопрепарати характеризувалися задовільним рівнем біологічної ефективності. Так, для Фітоциду (*Bacillus subtilis*), Планриз (*Pseudomonas fluorescens*) і Фітохелпу

(*Bacillus* spp.) цей показник становив 67,2 %, 57,7 і 62,3 % відповідно. Крім того, спостерігали значний рістстимулюючий ефект: висота пагонів рослин збільшувалася на 40–55 %, а загальна довжина коренів – на 40–48 %. Застосування біопрепаратів Фітоцид, ФітоХелп і Планриз сприяло підвищенню приживлюваності рослин на етапі їхньої адаптації на 18–26 %, 13–16 і 17–21 % відповідно.

Отже, застосування біопрепаратів Триходерміну, Фітоциду, ФітоХелпу і Планризу під час адаптації рослин суниці садової до умов закритого ґрунту на 17–28 % збільшує кількість адаптованих рослин, сприяє росту і підвищує стійкість рослин до ґрунтових фітопатогенів роду *Rhizoctonia* spp.

Розділ 4 «Експресія генів PR-білків рослин за дії хітозанів грибного і тваринного походження». Для дослідження індукованої хітозанами експресії генів PR-білків визначено фізико-хімічні характеристики хітозанів тваринного і грибного походження. Ключовими параметрами біологічної активності хітозанів є молекулярна маса і ступінь деацетилювання. Встановлено, що ступінь деацетилювання хітозану, отриманого з личинок *Hermetia illucens*, становив 90,69 %, з плодових тіл *Agaricus bisporus* – 80,39 %. Для визначення молекулярної маси хітозану визначали кінематичну в'язкість розчину хітозану з наперед відомою концентрацією. За допомогою конвертеру величин UnitConverter встановлено молекулярну масу біополімерів, яка для хітозану з *Hermetia illucens*, складала 3003 сП, що відповідає високомолекулярним сполукам. Для низькомолекулярного хітозану з *Agaricus bisporus* показник кінематичної в'язкості складав 111 сП.

Загальновідомо, що до складу грибного хітину і хітозану входять глюкани, які зв'язуються з глюкозамінним ланцюгом іонними і водневими зв'язками. Методом газової хроматографії визначено, що до складу грибного хітозану, крім глюкозамінів, входять шість моноцукрів, серед яких ідентифіковано рамнозу і фукозу з сумарною часткою 23 % (табл. 2).

Таблиця 2

Показники піків на хроматограмі та ідентифікація моноцукрів

№ з/п	Час утримання, хв	Висота піка	Площа піка	Моноцукор	Частка від загальної суми моноцукрів, %
1	4,263	19792	537632	н	14,978
2	4,568	20702	540457	н	15,056
3	4,936	22184	587834	рамноза	16,376
4	5,236	7999	238801	фукоза	6,653
5	16,649	57111	964664	н	26,874
6	58,819	50726	720152	н	20,063

Примітка. н – не ідентифіковано

Варто зазначити, що серед неідентифікованих цукрів найбільшу частку складали моноцукри (пік 5) з часом утримання 16,649 хв і (пік 6) з часом утримання 58,819 хв. Враховуючи, що ці моноцукри не входять до чистих глюканів, вони можуть створювати складну розгалужену систему полісахаридних структур, які суттєво вирізняють грибний хітозан від хітину і хітозану тваринного походження. Враховуючи, що хітозан грибного

походження, порівняно з хітозаном тваринного походження, має дещо нижчий вміст азоту і містить специфічні полісахаридні розгалуження, цілком ймовірно, що рослини здатні їх розпізнавати і розвивати специфічні захисні реакції за участі PR-білків.

Для дослідження експресії генів захисних білків після обробки модельних рослин розчинами хітозану на основі аналізу депонованих у GenBank нуклеотидних послідовностей було розроблено специфічні праймери для ампліфікації ділянок екзонів п'яти PR-генів тютюну звичайного: PR-1, PR-2a (кисла β -1,3-глюканаза), PR-2b (основна β -1,3-глюканаза), PR-3a (основна хітиназа), PR-3b (кисла хітиназа) та чотирьох PR-генів суниці садової: PR-1, PR-2a (β -1,3-глюканаза), PR-2b (ендо- β -1,4-глюканаза) і PR-3 (хітиназа) досліджених генів. Як референсний ген використовували ген актину, для якого раніше на інших моделях показано конститутивну експресію. Тестування ефективності сайт-специфічної ампліфікації обраних генів та оптимізацію умов полімеразну ланцюгову реакцію проводили за аналізу геномної ДНК.

За результатами досліджень встановлено, що перші ознаки впливу хітозану на експресію генів PR-білків було виявлено вже у перші години. Рівень відносної експресії генів залежав від біологічного походження хітозану, часу після обробки і самого гена. Загалом відносний рівень експресії генів PR-білків за обробки рослин низькомолекулярним хітозаном був вищим порівняно з високомолекулярним хітозаном за винятком гена PR-1, експресія якого практично не змінювалася за весь час експерименту. Білки PR-1 є стійкими до протеаз і виявляються в рослинних тканинах, що уражені вірусами, бактеріями і грибами. Оскільки в модельних експериментах патогенні організми не були задіяні, відсутність достовірних відмінностей і стійких тенденцій у загальній кількості мРНК під впливом хітозанів свідчить про те, що для даного класу PR-білків існують інші регуляторні тригери.

Встановлено, що за обробки низькомолекулярним хітозаном у листках тютюну звичайного зростання рівня експресії генів кислої β -1,3-глюканази та основної хітинази поступово зростало з максимумом через 72 год. Для генів основної β -1,3-глюканази рівень експресії зріс більш ніж у 3 рази з максимумом через 48 год. Експресія гену кислої хітинази характеризувалася двома піками через 12 та 72 год після обробки (рис. 2, а).

За обробки рослин високомолекулярним хітозаном рівень експресії всіх досліджуваних генів дещо варіював з найвищим значенням через 24 год для PR-2a, 48 год – для PR-2b. Для генів кислої та основної хітиназ максимум експресії припадав на 72 год (рис. 2, б). У рослин суниці садової за обробки низькомолекулярним хітозаном у листках вже за 1 год відносна кількість копій мРНК β -1,3-глюканази (PR-2a) поступово збільшувалася і досягала максимуму на 3 добу, для хітинази (PR-3) – різко зростала після 12 год. У випадку ендо- β -1,4-глюканази (PR-2b) рівень експресії гену мав хвилеподібний характер з максимумом прояву на 48 год (рис. 2, в). Подібну експресію генів, пов'язаних з патогенезом, з незначними відмінностями, спостерігали також і після обробки рослин високомолекулярним хітозаном (рис. 2, г).

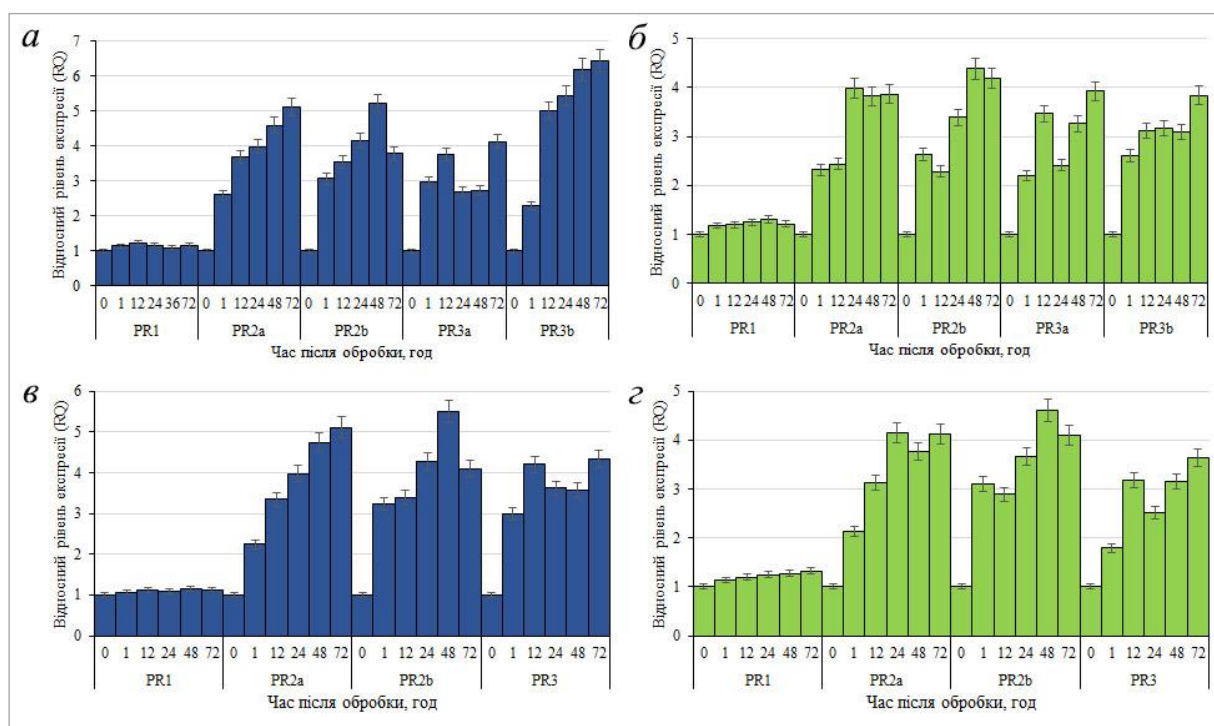


Рис. 2. Відносний рівень експресії (RQ) досліджених генів PR-білків: а – *N. tabacum*; б – *F. ananassa* відносно референсного гену актину за обробки розчинами низькомолекулярним хітозаном (а, в) і високомолекулярним хітозаном (б, г).

Отже, реакції рослин *N. tabacum* і *F. ananassa* підтвердили їхню високу чутливість до хітозану, а також його здатність проникати у тканини рослин і взаємодіяти з відповідними сенсорними системами, які відповідають за індуковані захисні реакції.

Розділ 5 «Специфіка захисних реакцій рослин модельних культур за дії хітозанів грибного і тваринного походження». Фенольні речовини є важливою складовою системної стійкості рослин проти фітопатогенів. У дослідженні реакцій відповіді рослин *F. ananassa* на обробку хітозанами різного походження і молекулярної маси як основні показники використовували вміст фенолів, катехінів, флавоноїдів і загальний антиоксидантний потенціал вторинних метаболітів.

Методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у листках *F. ananassa* виявлено 9 основних фенольних сполук, зокрема, гідролізовані таніни, похідні галової, елагової кислот і флавоноїди (рис. 3).

У експерименті для рослин *F. ananassa* встановлено добову динаміку вмісту фенольних речовин. Так, увечері загальна кількість фенолів у листках знижувалася. Короткочасний ефект пов'язаний зі зниженням температури й інтенсивності транспірації після обробки рослин водою, а тривале зниження вмісту фенольних речовин є проявом природних циркадіанних ритмів. Добові коливання загального вмісту фенольних речовин можуть бути пов'язані з полімеризацією й інтеграцією в клітинні стінки як складових компонентів лігніну і суберину.

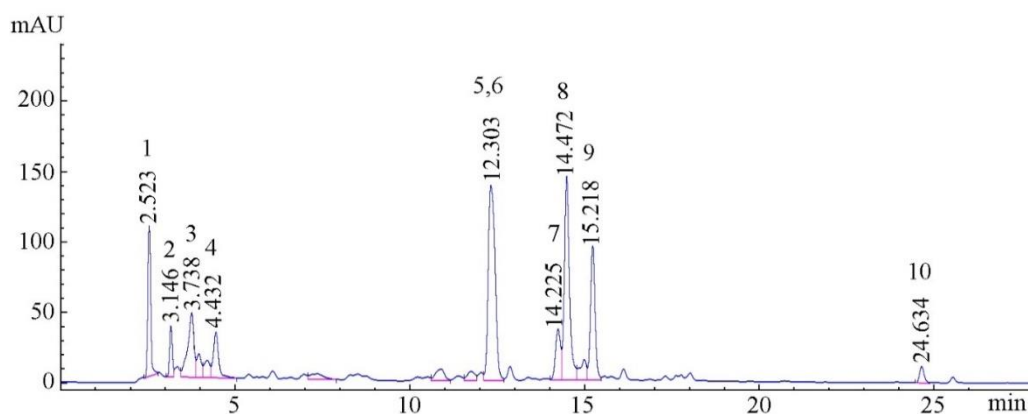


Рис. 3. ВЕРХ-профіль листків суниці садової до обробки хітозаном: пік 1 – 2,3-S-гексагідроксифеніл D-глюкоза; пік 2 – галоїлхінна кислота; пік 3 – елаготанін; пік 4 – елаготанін; піки 5, 6 – пентозид елагової кислоти; пік 7 – елаготанін; пік 8 – елагова кислота; пік 9 – глікозид кемпферола; пік 10 – тілірозид

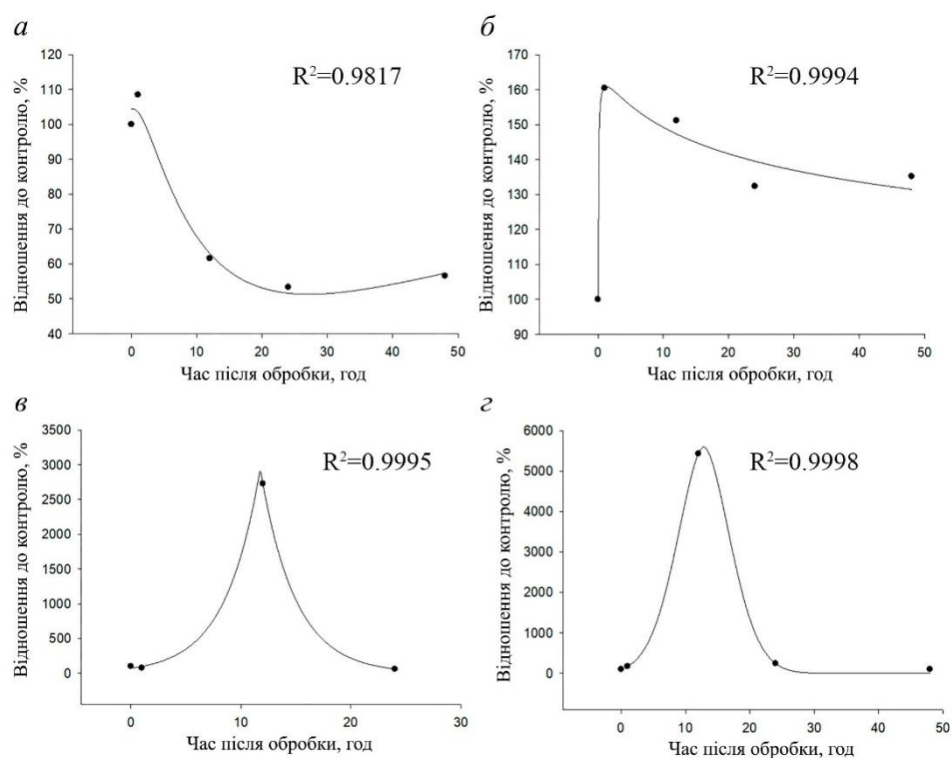


Рис. 4. Динаміка вмісту елагової кислоти (а, б) і 2,3-S-гексагідроксифеніл D-глюкози (в, г) в листках *F. ananassa* після обробки низькомолекулярним хітозаном (а, в) і високомолекулярним хітозаном (б, г)

Обробка рослин *F. ananassa* хітозаном показала високу реактивність відповідних фізіологічних реакцій. Після обробки рослин низькомолекулярним хітозаном і високомолекулярним хітозаном вже через 1 год у листках істотно збільшувався вміст елагової кислоти, за 12 год її кількість зменшувалася (рис. 4). Важливо зазначити, що тенденцію до поступового збільшення вмісту елагової кислоти в листках рослин вночі з подальшим зниженням її кількості вдень, виявлено тільки у контрольних рослин (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив низько- і високомолекулярного хітозанів на вміст фенольних сполук в листках *Fragaria ananassa* Duch.

Обробка	Час, год	Вміст фенольних сполук, мг/мл									
		Пік 1	Пік 2	Пік 3	Пік 4	Пік 5,6	Пік 7	Пік 8	Пік 9	Пік 10	Загальна кількість
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Контроль	0	0,61±0,009 ^b	0,03±0,001 ^b	0,55±0,006 ^b	0,74±0,006^b	0,23±0,003 ^b	0,49±0,01	0,25±0,003	0,62±0,008 ^b	0,00	3,53±0,02^b
	1	0,91±0,007 ^b	0,07±0,001 ^b	0,66±0,009 ^a	0,01±0,001 ^b	0,35±0,005 ^a	0,01±0,001	0,36±0,005 ^b	0,78±0,006^b	0,00	3,15±0,01 ^b
	12	0,95±0,01	0,07±0,001^b	0,01±0,001	0,06±0,001 ^b	0,37±0,004^a	0,00	0,57±0,006^b	0,68±0,01 ^b	0,21±0,004	2,93±0,03 ^b
	24	0,80±0,02 ^b	0,06±0,002 ^b	0,87±0,007^b	0,02±0,001 ^a	0,26±0,003 ^b	0,02±0,001 ^b	0,34±0,004 ^b	0,58±0,005 ^b	0,22±0,004	3,17±0,03 ^b
	48	0,60±0,01 ^b	0,03±0,001 ^b	0,83±0,008 ^b	0,02±0,001 ^a	0,26±0,004 ^b	0,02±0,001	0,25±0,004 ^b	0,59±0,007 ^b	0,00	2,61±0,01 ^b
Низько-молекулярний хітозан	0	0,03±0,001	0,16±0,003^b	0,03±0,001	0,09±0,002 ^b	0,38±0,005 ^b	0,00	0,05±0,001	0,88±0,008^b	0,00	1,62±0,01
	1	0,02±0,001 ^b	0,12±0,002 ^b	0,02±0,001	0,10±0,002^b	0,40±0,005^a	0,00	0,53±0,007^b	0,78±0,003	0,00	1,97±0,006 ^b
	12	0,85±0,02	0,03±0,001 ^b	0,80±0,01	0,01±0,001 ^b	0,29±0,002	0,02±0,001	0,30±0,003 ^b	0,78±0,002	0,15±0,004	3,23±0,02 ^b
	24	0,02±0,001 ^b	0,11±0,003 ^b	0,97±0,004^b	0,02±0,001	0,25±0,006	0,50±0,01 ^b	0,26±0,005 ^b	0,64±0,01 ^b	0,00	2,78±0,02 ^b
	48	0,95±0,02^b	0,04±0,001	0,88±0,008 ^b	0,02±0,001	0,24±0,005 ^b	0,99±0,007	0,27±0,005	0,63±0,004 ^b	0,19±0,004	4,22±0,01^b
Високо-молекулярний хітозан	0	0,02±0,001 ^b	0,12±0,002 ^b	0,01±0,0002 ^b	0,03±0,001 ^b	0,30±0,004 ^b	0,02±0,001	0,30±0,004	0,77±0,007 ^b	0,00	1,57±0,006 ^b
	1	0,03±0,001	0,21±0,003^b	0,02±0,001^a	0,07±0,002	0,35±0,005	0,00	0,48±0,004^b	0,94±0,006^b	0,00	2,1±0,007 ^b
	12	0,95±0,008	0,07±0,001	0,01±0,001	0,04±0,001	0,28±0,007 ^a	0,06±0,001	0,45±0,007 ^b	0,79±0,006 ^b	0,00	2,65±0,009^b
	24	0,04±0,001	0,16±0,003 ^b	0,02±0,001 ^b	0,09±0,003^a	0,31±0,005 ^b	0,04±0,001	0,39±0,009 ^b	0,71±0,009 ^b	0,05±0,001	1,82±0,008 ^b
	48	0,02±0,001 ^b	0,08±0,002 ^b	0,01±0,001 ^b	0,06±0,001 ^a	0,31±0,005 ^b	0,00	0,40±0,007 ^b	0,78±0,006 ^b	0,00	1,66±0,01 ^b

Примітка. Достовірну різницю відносно контролю оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу, а – достовірна різниця за $p < 0,05$; b – достовірна різниця за $p < 0,01$; A – 2,3-S-гексагідроксидифеніл D-глюкоза; B – галоїлхінна кислота; C – елаготанін; D – елаготанін; E – пентозид елагової кислоти і глікозид кемпферола; F – елаготанін; G – елагова кислота; H – глікозид кемпферола, I – тілірозид. Напівжирним виділені максимальні значення

Обробка рослин хітозанами сприяла активному збільшенню її кількості в листках *F. ananassa*. Водночас частка індивідуальних компонентів загального фенольного комплексу в листках є досить варіабельним показником. Так, коефіцієнт варіації загального вмісту фенолів у листках становить 50,1 %, при цьому в межах сорту найбільші відмінності встановлені для 2,3-S-гексагідроксибеніл D-глюкози (пік 1, табл. 3) та елаготанінів (піки 3, 4 і 7, табл. 3). Також виявлено добову динаміку якісного і кількісного складу елаготанінів і флавоноїдів у листках суниці садової. Добові коливання індивідуальних фенольних сполук характерні для групи елаготанінів (піки 3, 4 і 7, табл. 3), а також для кемпферол-3-b-D-[6-O-(E)-кумароїл]-глюкопіранозиду (тілірозиду) (пік 10, табл. 3). Найстабільнішими показниками в листках цього сорту були вміст глікозиду кемпферолу (пік 6, 9, табл. 3) і пентозид елагової кислоти (пік 5, табл. 3).

Встановлено, що обробка рослин розчином низькомолекулярного хітозану активізувала фенілпропановий шлях утворення танінів, нівелюючи добову динаміку вторинного метаболізму. Перші ознаки істотних змін вмісту в листі фенольних речовин було виявлено в перші години. При обробці рослин низькомолекулярним хітозаном в листках вже за 12 год кількість загальних фенолів і антиоксидантів збільшувалася в 1,9 і 3,2 рази відповідно (рис. 5).

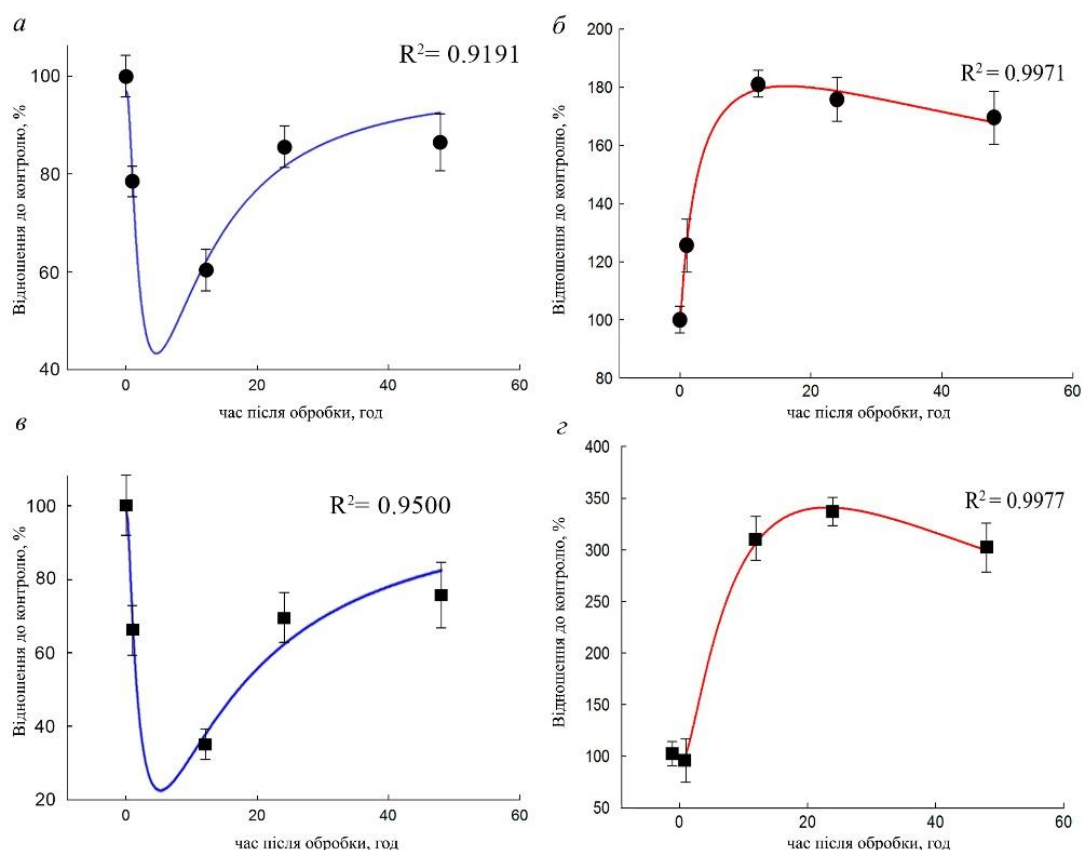


Рис. 5. Динаміка вмісту в лисках *F. ananassa* фенольних сполук (а, б) та антиоксидантної активності (в, г) після обробки: а, в – водою (контроль); б, г – низькомолекулярний хітозан. Початковий показник (до обробки) дорівнює 100 %

На відміну від низькомолекулярного хітозану, розчин високомолекулярного полімеру індукував у листках значне зниження вмісту вільних і слабозв'язаних з клітинними стінками фенольних сполук (рис. 6).

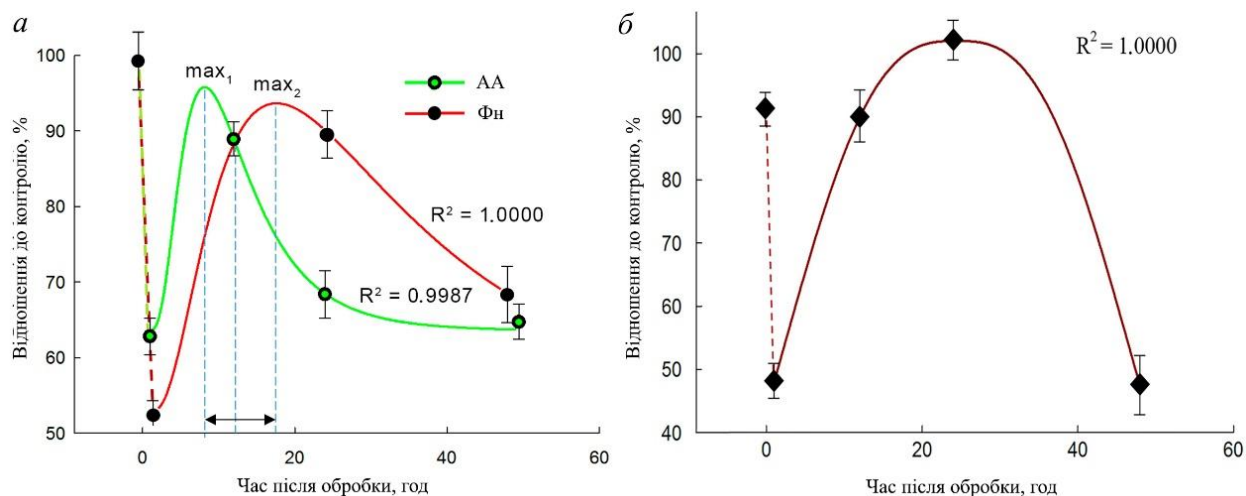


Рис. 6. Синхронізований вміст фенольних сполук (а), антиоксидантів (а) і катехінів (б) в листках суниці садової після обробки високомолекулярним хітозаном: ФН – вміст фенольних сполук (співвідношення до початкового показника, %); АА – антиоксидантна активність (співвідношення до початкового показника, %)

Отже, виявлено відмінності в первинних адаптивних реакціях рослин на хітозан. Вони залежать від походження хітозану, його молекулярної маси і ступеня деацетилювання. Низькомолекулярний хітозан швидко долає тканинні бар'єри, проникає в протопласт і викликає різке збільшення вмісту фенолів і підвищення антиоксидантного потенціалу тканин листків. Значне збільшення вмісту фенолів і загального антиоксидантного потенціалу у відповідь на дію низькомолекулярного хітозану грибного походження можна розглядати як загальну мобілізацію рослинного організму проти потенційного патогена.

Сила і швидкість реакції передбачає наявність у рослин *F. ananassa* відповідної системи сприйняття молекулярного тригера (елісатора) і запуску відповідних фізіологічних реакцій. Принципова відмінність в реакціях модельних рослин на високомолекулярний хітозан з личинок *Hermetia illucens* свідчить про наявність іншої системи сприйняття сигналу.

Встановлено, що після інокуляції листків *N. tabacum* штамом *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 у зонах безпосереднього впливу бактерій вже за 48 год з'являються некротичні ураження. У подальшому, залежно від варіанту обробки, рослини-регенеранти *N. tabacum* за показником зменшення площі ураження листків розташувалися наступним чином: контроль > хітозан І (низькомолекулярний хітозан) > хітозан ІІ (100–200 кДа) > хітозан ІІІ (високомолекулярний хітозан).

За співставленням динаміки вмісту фенольних сполук у контрольної групи рослин відмінність між інокульованими і неінокульованими листками була незначною. Достовірна різниця ($p < 0,05$) визначалася лише за 18 і 72 год. Підвищення концентрації фенолів з часом була чітко вираженою у листків

з ознаками ураження (коефіцієнт кореляції $r=0,985$; $p<0,015$). Достовірне збільшення концентрації фенольних сполук у тканинах інокульованих листків на фоні загального зменшення їхнього вмісту визначено також для рослин, які обробляли хітозаном I ($r=0,953$; $p<0,047$), хітозаном II ($r=0,996$; $p<0,004$). За обробки рослин хітозаном III ця залежність нівелювалася. За кількісними показниками хітозан II з молекулярною масою 100–300 кДа найбільшою мірою стимулював синтез фенольних сполук у рослин, що пояснює його високу ефективність у розвитку захисних реакцій рослин після попередньої обробки. За показником вмісту флавоноїдів реакції відповіді в цілому мають подібну тенденцію. Водночас за обробки рослин хітозаном III у листках спостерігали лінійне підвищення вмісту флавоноїдів, аналогічно з контрольними рослинами, а після обробки хітозаном I й II у перші 18 год – зменшувалися.

Розділ 6 «Вплив хітозану грибного і тваринного походження на видовий склад мікобіоти модельних культур». У результаті досліджень видового складу епіфітної мікобіоти листків суниці садової до та після обробки рослин суниці садової розчинами хітозанів загалом виявлено 13 видів грибів із 11 родів відділу Ascomycota. Серед них було ідентифіковано види *Fusarium* – збудники в'янення і кореневих гнилей суниці садової. Найчастіше на листках суниці садової траплялися види *Alternaria tenuissima* (92,3 %), *Penicillium* sp. (76,9 %) і *Fusarium* sp. (69,2 %). Високим рівнем заселення листків суниці садової в контролі характеризувався гриб *Humicola fuscoatra* (50,0 %), після обробки низькомолекулярним і високомолекулярним хітозанами – *Alternaria tenuissima* (44,4 і 37,5 %), *Fusarium* sp. і *Penicillium* sp. (37,5 %). Мікроміцет *Aspergillus nidulans* і фітопатоген *Nigrospora oryzae* виділяли з листків суниці садової в контрольній групі, вид *Trichoderma viride* ізолювали після застосування низькомолекулярного хітозану через 48 год.

Найбільшу видову різноманітність епіфітних мікроміцетів (11 видів) спостерігали на листках в контролі, також по 6 видів грибів ізолювано через 1 год після обробки водою та через 48 год після обробки низькомолекулярним хітозаном. Найменше грибів виділяли з листків суниці садової, оброблених водою після експозиції 12–48 год, де їхня кількість становила 2–3 види. Однак, мікобіоти у цих варіантах досліду виявилися повністю відмінними, про що свідчить коефіцієнт спільності Стюгрен-Радулеску $\rho=1,0$. Подібними між собою виявилися угруповання грибів, ізолюваних із листків модельних рослин після обробки водою і високомолекулярним хітозаном через 48 год ($\rho=0,40$). Схожими виявилися й епіфітні мікобіоти після застосування низькомолекулярного хітозану (експозиція 12 год) і високомолекулярного хітозану через 24 год. Не виявлено відмінності у видовому складі мікроміцетів, виділених з поверхні листків, оброблених високомолекулярним хітозаном за різної експозиції ($\rho=0,40$).

У результаті досліджень ризоплани суниці садової після обробки водою і хітозанами ізолювано та ідентифіковано 8 видів грибів, серед яких виявлено збудників хвороб кореневої системи: *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma herbarum* і *Rhizoctonia* sp. Висока частота трапляння була характерна для видів *C. destructans* 85,7 % і *Penicillium* sp. 57,1 %. Найвищий

рівень заселення (50,0 %) коренів суниці садової муковоривим грибом *Mortierella isabellina* відмічено через 48 год після обробки рослин водою. Це пояснюється тим, що муковорі гриби надають перевагу субстратам з підвищеною вологістю. Однак *M. isabellina* не виділяли з ризоплани суниці садової, обробленої низькомолекулярним і високомолекулярним хітозанами, що узгоджується з даними інших дослідників про те, що муковорі гриби є чутливими до впливу хітозанів з різною молекулярною масою. Високим рівнем заселення характеризувалися види *C. destructans* і *F. oxysporum* (37,5 %) через 12 і 48 год відповідно після обробки низькомолекулярним хітозаном. Слід зазначити, що фузаріум ізолювали через 48 год після застосування на суниці обох розчинів. Виявлено, що збудник чорної гнилі коренів і ягід *Rhizoctonia*, а також мікроміцет-антагоніст *Trichoderma viride* не виділяли з ризоплани після обробки розчинами хітозанів.

Найчисельнішим серед мікобіоти ризосфери виявився *Penicillium* sp., кількість якого становила 47,4 тис. КУО/г ґрунту в контролі, після обробки водою через 12 і 48 год – 20,7 і 22,7 тис. КУО/г ґрунту відповідно. Застосування низькомолекулярного хітозану значно вплинуло на його чисельність, яка становила 4,9 і 6,3 тис. КУО/г ґрунту через 12 і 48 год після внесення відповідно. Даний вид не ізолювали через 12 год після обробки високомолекулярним хітозаном, але через 48 год його кількість становила 18,7 тис. КУО/г ґрунту. Загалом для пеніциліїв була характерною тенденція до зменшення чисельності у ґрунті після обробки різними формами хітозанів. Для фузаріумів, навпаки, спостерігали збільшення чисельності з експозицією обробки як водою, так і розчинами хітозанів. Це можна пояснити тим, що гриби роду *Fusarium* у ґрунті знаходяться переважно в активному стані, і, за даними літератури, є більш стійким до впливу хітозанів з різною молекулярною масою.

Розділ 7 «Антимікробна активність хітозану та біологічно активних композицій на його основі». Велика кількість функціональних груп забезпечує хітозанам можливість утворення комплексів з іншими хімічними сполуками, що дозволяє комбінувати і змінювати їхню активність. Так, встановлено зміну антибактеріальної активності і пролонгованості дії хітозану, сорбінової кислоти та їх комплексу щодо різних ізолятів і штамів фітопатогенних бактерій. Визначено бактеріостатичний ефект суміші хітозану і сорбінової кислоти на бактеріальних ізолятах PSP-31 і PSP-33. У ізолятів PP-42 і PSP-35 спостерігали біоцидну дію окремо хітозану (діаметр зони пригнічення росту становив 17,6 мм) і бактеріостатичну дію сорбінової кислоти. На 6 добу діаметр зони відсутності росту *C. michiganisens* на середовищі з комплексом хітозану і сорбіновою кислотою (1:0,5) становив 6,4 мм.

Композиція хітозану і сорбінової кислоти також пригнічувала ріст міцелію ізолятів збудників родів *Fusarium* і *Alternaria*. Діаметр зони відсутності росту навколо лунок з розчинами на 3 добу експозиції у варіантах окремо з хітозаном і сорбіновою кислотою ізолятів збудників ІЗ FO-23 і ІЗ FS-14 коливався в межах 4,9–8,5 мм, ІЗ АТ-35 і ІЗ АТ-37 – 6,8–14,1 мм. Суміш речовин пригнічувала ріст міцелію, при цьому діаметр зони відсутності росту становив 8,4–10,8 і 9,6–18,6 мм відповідно, що свідчить про адитивний ефект взаємодії речовин

щодо фітопатогенних мікроміцетів. У ізоляту ІЗ FO-21 спостерігали послаблення інтенсивності розвитку міцелію і спороношення.

ВИСНОВКИ

У дисертації встановлено особливості впливу саліцилової кислоти і хітозанів різного біологічного походження і молекулярної маси на морфогенез модельних рослин, динаміку синтезу ними фенольних сполук, видову різноманітність мікобіоти філоплани, ризосфери, епіфітних мікроміцетів, збудників бактеріозів і мікозів.

1. Визначено основні фізико-хімічні і біохімічні відмінності хітозанів, що отримані з плодових тіл *Agaricus bisporus* і личинок *Hermetia illucens*. У складі грибного хітозану виявлено 6 моноцукрів, зокрема, рамнозу (16,4 %) і фукозу (6,7 %).

2. Встановлено, що за впливу саліцилової кислоти у листках *Fragaria ananassa* Duch. відбувається перебудова вторинного метаболізму, яка супроводжується синтезом біологічно активних сполук, у тому числі терпеноїдів і кон'югатів оксикоричних кислот з властивостями регуляторів росту. За наявності у живильному середовищі саліцилової кислоти (25 мг/мл) у рослин-регенерантів *in vitro* посилюється обернена залежність ($r=-0,90$) між площею листків і вмістом флавоноїдів.

3. Виявлено, що рівень відносної експресії генів PR-білків залежить від біологічного походження хітозану, яким обробляють рослини *Fragaria ananassa* Duch. Відносний рівень експресії генів патоген залежних білків після обробки рослин низькомолекулярним хітозаном зростає у 1,5–2 рази порівняно з високомолекулярним біополімером. Після обробки рослин хітозаном вже за 1 год кількість копій мРНК 1,3-глюканази (PR-2a) у листках збільшується і досягає максимуму на 3 добу, експресія генів хітинази (PR-3) зростає після 12 год, водночас експресія гену основної β -1,3-глюканази (PR-2b) має хвилеподібну динаміку з максимумом активності на 48 год.

4. У листках *Fragaria ananassa* Duch. виявлено добові коливання вмісту фенольних сполук, зокрема, елаготанінів і флавоноїдів. Встановлено, що обробка рослин низькомолекулярним хітозаном активізує в листках синтез елагітанінів, а кількість загальних фенолів і антиоксидантів за 12 год збільшується в 1,9 і 3,2 рази відповідно, що свідчить про мобілізацію захисних систем рослинного організму в умовах окиснювального стресу.

5. З'ясовано, що видовий склад мікобіот філоплани і ризосфери рослин *Fragaria ananassa* Duch. достовірно відрізняється. Підтверджено, що міцелій епіфітних мікроміцетів є малочутливим до розчинів хітозану і його похідних, а склад епіфітної мікобіоти достовірно не змінюється впродовж 48 год після обробки рослин. Найбільшу видову різноманітність епіфітних мікроміцетів (11 видів) виявлено на листках контрольних рослин. Доведено, що за обробки низькомолекулярним хітозаном видовий склад мікобіоти філоплани суниці садової суттєво відрізняється від контрольної групи рослин (коефіцієнт спільності Стугрена-Радулеску $\rho=1,0$). Подібними виявилися угруповання

мікроміцетів, які ізолювано з листків модельних рослин після обробки водою і високомолекулярним хітозаном (коефіцієнт спільності Стугрена-Радулеску $\rho=0,40$).

6. Виявлено пролонгованість дії та різну чутливість ізолятів і штамів фітопатогенних мікроорганізмів до хітозану, сорбінової кислоти окремо та у комплексі. Встановлено адитивну бактеріостатичну дію композицій хітозану з сорбіновою кислотою, яка, порівняно з індивідуальними компонентами, зростала по відношенню до збудників бактеріозів: в 1,4–2,7 раза до ізоляту PSP-31, у 1,23–2,7 раза – до PP-43, у 1,4–1,5 раз – до штамів *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7750 та у 1,9–2,0 рази – до *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 8982; антифунгальна дія підвищувалась в 1,3–1,8 рази проти *Fusarium* spp. і в 1,4–2,2 раза – проти *Alternaria* spp.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія

1. Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф., Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В., Спиридонов В. Г., Середа О. В., Дубін О. В., **Субін О. В.**, Присяжнюк Л. М., Буценко Л. М., Пасічник Л. А., Волощук Н. М., Башта О. В., Пальчиковська Л. Г., Седих О. Ю., Сорокін О. С., Ширина Т. В. Біополімерні комплекси та гетероциклічні сполуки в системі захисту рослин: монографія. К., 2020. 227 с. (Здобувачем взято участь у проведенні наукових досліджень, підготовці матеріалів для друку).

Статті у наукових фахових виданнях України,

у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних

2. Субін О. В. Мікроклональне розмноження суниці садової (*Fragaria Ananassa* Duch.) сорту Аліна в культурі *in vitro*. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. 2015. № 214. С. 281–288.

3. **Субін О. В.**, Мельничук М. Д., Ліханов А. Ф., Кляченко О. Л. Вплив саліцилової кислоти на органогенез рослин суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) у культурі *in vitro*. Фізіологія рослин і генетика. 2016. № 1. С. 26–33. (Здобувачем проведено постановку експерименту, визначено кількість фенолів, флавоноїдів, пластидних пігментів, проведено біотест на гіберелову активність, підготовлено матеріали до друку).

4. **Subin O. V.**, Melnychuk M. D., Likhanov A. F., Spyrydonov V. G. Effect of chitosan of different origins on the contents of phenolic antioxidants in *Fragaria ananassa* Duch. leaves. Фізіологія рослин і генетика. 2018. № 2. Р. 124–133. (Здобувачем проведено постановку експерименту, визначено загальний вміст фенолів, визначено антиоксидантну активність, підготовлено матеріали до друку).

5. Волощук Н. М., Ліханов А. Ф., **Субін О. В.** Динаміка видового складу мікобіоти філоплани та ризосфери *Fragaria ananassa* Duch. під дією розчинів хітозану. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні

системи). 2020. Т. 12. № 1. С. 39–51. (Здобувачем проведено постановку експерименту, підготовлено матеріали до друку).

6. Бородай В. В., **Субін О. В.**, Ліханов А. Ф. Дослідження антимікробної дії хітозану біологічно активних композицій на його основі. Біологічні системи: теорія та інновації. 2020. Т. 11. № 4. С. 18–25. (Здобувачем підібрано умови для проведення експерименту, підготовлено матеріали до друку).

Статті у наукових виданнях інших держав, включених до міжнародної наукометричної бази даних Scopus

7. Dubin A., Likhanov A., Klyachenko O., **Subin A.**, Klyuvadenko A. Effect of chitosan formulations of different biological origin on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) PR-genes expression. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences. 2020. Vol. 9. № 6. P. 1141–1144. (Здобувачем проведено постановку експерименту, виділено РНК та отримано кДНК).

8. **Subin O. V.**, Likhanov A. F., Sereda O. V., Klyuvadenko A. A., Melnychuk M. D. Dynamics of phenolic compounds in leaves of *Fragaria ananassa* Duch. After treatment with different forms of chitosan. Biotechnologia. Journal of biotechnology, computational biology and bionanotechnology. 2020. Vol. 101 (3). P. 227–237. (Здобувачем визначено фізико-хімічні властивості хітозанів, проведено постановку експерименту, підготовлено матеріали до друку).

Стаття в іншому науковому виданні України

9. **Субін О. В.**, Ткаленко Г. М., Бородай В. В., Ліханов А. Ф. Адаптація рослин-регенерантів суниці садової до умов *ex vitro* за застосування біопрепаратів. Агробіологія. 2016. № 2 (128). С. 85–90. (Здобувачем проведено адаптацію рослин-регенерантів суниці садової).

Методичні рекомендації

10. Кляченко О. Л., Ліханов А. Ф., Присяжнюк Л. М., Клюваденко А. А., **Субін О. В.** Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин: науково-методичні рекомендації. К., 2019. 35 с. (Здобувачем підібрано специфічні праймери для ампліфікації екзонних ділянок генів, що кодують PR-білки модельних культур для визначення чутливості захисних систем рослин за дії тестованих препаратів хітозану).

Тези наукових доповідей

11. Васюхно Ю. П., Ліханов А. Ф., **Субін О. В.** Мікроклональне розмноження суниці садової (*Fragaria Ananassa* Duch.) сорту Аліна в культурі *in vitro*. Біотехнологія: звершення та надії: IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 21–22 травня 2015 року: тези доповіді. К., 2015. С. 18. (Здобувачем експериментально підібрано живильні середовища для мікроклонального розмноження суниці садової).

12. **Субін А. В.**, Мельничук М. Д., Ліханов А. Ф., Спирочкина М. Н. Влияние салициловой кислоты на морфогенные процессы *Fragaria ananassa*

Duch. в культурі *in vitro*. Регуляція росту, розвитку і продуктивності рослин: VIII Міжнародна конференція, г. Минск, Республіка Беларусь, 28–30 жовтня 2015 року: тези доповіді. Минск, 2015. С. 116. (Здобувачем поставлено експеримент з дослідження впливу саліцилової кислоти на морфогенні процеси суниці садової, підготовлено матеріал до друку).

13. Субін О. В. Мікроклональне розмноження високопродуктивних сортів суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.). Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: IV Міжнародна науково-практична конференція молодих учених, с. Центральне, 21 квітня 2016: тези доповіді. Центральне, 2016. С. 105.

14. **Subin O.**, Melnychuk M., Likhanov A. Effect of different origin chitosan on the accumulation of phenolic antioxidants in *Fragaria ananassa* leaves. Biotechnology: science I practice: IV International scientific conference of young researches, Yerevan, 28–30 September, 2017: abstract. Yerevan, 2017. P. 35. (Здобувачем проведено постановку експерименту, визначено фізико-хімічні властивості хітозанів, визначено вміст фенолів та антиоксидантну активність).

15. **Subin O. V.**, Dubin O. V., Likhanov A. F., Yefanova D. T., Palchykovska L. G., Kostenko S. M., Klyuvadenko A. A. Chitosan-mediated regulation of nucleic acid synthesis and gene expression of PR-proteins. Smart Bio: 2nd International conference, Kaunas, 03–05 May 2018: abstract. Kaunas, 2018. P. 308. (Здобувачем проведено постановку експерименту, виділено РНК).

АНОТАЦІЯ

Субін О. В. Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) проти основних фітопатогенів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 06.01.11 «Фітопатологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2021.

Дисертацію присвячено дослідженню еліситорних властивостей і прямої біоцидної дії хітозану різного біологічного походження проти основних фітопатогенів суниці садової. Показано особливості індукції відповідних реакцій модельних рослин *F. ananassa* у відповідь на обробку розчинами хітозану.

Встановлено індукцію перебудови вторинного метаболізму за впливу саліцилової кислоти з активним синтезом терпеноїдів і кон'югатів оксикоричних кислот з властивостями неспецифічних регуляторів росту. Показано особливості моносахаридного складу хітозану, отриманого з плодових тіл *Agaricus bisporus*.

Виявлено особливості рівня відносної експресії генів PR-білків PR-1, PR-2a (β-1,3-глюканаза), PR-2b (ендо-β-1,4- глюканаза) і PR-3 (хітиназа) рослин *F. ananassa* залежно від біологічного походження хітозану і часу після обробки. Відносний рівень експресії даних генів за обробки рослин низькомолекулярним хітозаном був вищим порівняно з високомолекулярним.

Встановлено відмінності реакцій відповіді рослин суниці садової на обробку низькомолекулярним і високомолекулярним хітозанами. За обробки рослин низькомолекулярним хітозаном у листках вже за 12 год кількість загальних фенолів і антиоксидантів збільшувалася в 1,9 і 3,2 рази відповідно. На відміну від низькомолекулярного хітозану, розчин високомолекулярного полімеру спричиняв у листках різке зниження вмісту вільних і слабкозв'язаних з клітинними стінками фенольних сполук. Показано особливості накопичення елагової кислоти як одного із ключових компонентів в системі первинних захисних реакцій рослин проти збудників хвороб. Виявлено добові коливання показників вмісту фенольних сполук, зокрема, елаготанінів і флавоноїдів у листках *F. ananassa* як одного з основних механізмів адаптації рослин до несприятливих факторів.

Визначено динаміку видового складу мікобіоти філоплани, ризоплани і ризосфери суниці садової за дії низькомолекулярного і високомолекулярного хітозанів. Показано відмінності впливу хітозанів різного біологічного походження на угруповання мікроміцетів. Доведено, що комплекс хітозану з сорбіновою кислотою має пролонговану антибактеріальну дію щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* і *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* та антифунгальну дію щодо *Fusarium* spp. і *Alternaria* spp.

Ключові слова: *Fragaria ananassa* Duch., еліситор, хітозан, захисні механізми, вторинні метаболіти, елаготаніни, PR-білки, фітопатогени.

АННОТАЦИЯ

Субин А. В. Индуцированная устойчивость земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) против основных фитопатогенов. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.01.11 «Фитопатология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2021.

Диссертация посвящена исследованию элиситорных свойств и прямому биоцидному действию хитозана различного биологического происхождения против основных фитопатогенов земляники садовой. Показаны особенности индукции ответных реакций модельных растений *F. ananassa* после обработки растворами хитозана.

Установлена индукция перестройки вторичного метаболизма при воздействии салициловой кислоты с активным синтезом терпеноидов и конъюгатов оксикоричных кислот со свойствами неспецифических регуляторов роста. Показаны особенности моносакхаридного состава хитозана, полученного из плодовых тел *Agaricus bisporus*.

Выявлены особенности уровня относительной экспрессии генов PR-белков PR-1, PR-2a (β -1,3-глюканаза), PR-2b (эндо- β -1,4 глюканаза) и PR-3 (хитиназа) растений *F. ananassa* в зависимости от биологического происхождения хитозана и времени после обработки. Относительный уровень

экспрессии данных генов при обработке растений низкомолекулярным хитозаном был выше по сравнению с высокомолекулярным.

Установлены различия ответных реакций растений земляники садовой на обработку низкомолекулярным и высокомолекулярным хитозаном. При обработке растений низкомолекулярным хитозаном в листьях уже через 12 часов количество общих фенолов и антиоксидантов увеличивалось в 1,9 и 3,2 раза соответственно. В отличие от низкомолекулярного хитозана, раствор высокомолекулярного полимера вызвал в листьях резкое снижение содержания свободных и слабосвязанных с клеточными стенками фенольных соединений. Показаны особенности накопления эллаговой кислоты как одного из ключевых компонентов в системе первичных защитных реакций растений против возбудителей болезней. Выявлены суточные колебания показателей содержания фенольных соединений, в частности эллаготанинов и флавоноидов, в листьях *F. ananassa* как одного из основных механизмов адаптации растений к неблагоприятным факторам.

Определена динамика видового состава микобиоты филопланы, ризопланы и ризосферы земляники садовой после обработки низкомолекулярным и высокомолекулярным хитозаном. Показаны различия влияния хитозана различного биологического происхождения на комплексы микромицетов. Доказано, что комплекс хитозана с сорбиновой кислотой обладает пролонгированным антибактериальным действием по отношению к *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* и *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* и антифунгальным эффектом к *Fusarium* spp. и *Alternaria* spp.

Ключевые слова: *Fragaria ananassa* Duch., элиситор, хитозан, защитные механизмы, вторичные метаболиты, эллаготанины, PR-белки, фитопатогены.

ANNOTATION

Subin O. V. Induced Resistance of Strawberry Plants (*Fragaria ananassa* Duch.) Against Main Phytopathogens. – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Thesis for a candidate degree of biological sciences in specialty 06.01.11 «Phytopathology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of eliciting properties and direct biocidal action of chitosan of various biological origins against the main phytopathogens of strawberry. The peculiarities of induction of the corresponding reactions of *F. ananassa* in response to treatment with chitosan solutions are shown.

The induction of reconstruction of secondary metabolism for the influence of salicylic acid with an active synthesis of terpenoids and conjugates of oxycoric acids with the properties of nonspecific growth regulators is established. The peculiarities of the monosaccharide composition of chitosan derived from *Agaricus bisporus* are shown.

The features of the level of relative expression of PR-proteins PR-1, PR-2a (β -1,3-glucanase), PR-2b (endo- β -1,4-glucanase), and PR-3 (chitinase) of *F. ananassa*

plants depending on the biological origin of chitosan, time after treatment is revealed. The relative level of gene data expression under plant treatment with low molecular weight chitosan was higher compared to high molecular weight one.

The differences in the response reactions of the strawberry for processing low molecular weight chitosan and high molecular weight one are established. For processing plants with low molecular weight chitosan in leaves for 12 hours, the number of common phenols and antioxidants increased by 1.9 and 3.2 times, respectively. Unlike low molecular weight chitosan, a solution of high molecular weight one polymer caused a sharp decrease in the content of free and weakly linked with cellular walls phenolic compounds. The peculiarities of accumulation of ellagic acid as one of the key components in the system of primary protective reactions of plants against pathogens are established. Daily oscillations of the parameters of phenolic compounds are detected, in particular ellagitannins and flavonoids in *F. ananassa* leaves, as one of the main mechanisms in the adaptation of plants to stress factors.

The dynamics of the species composition of phylloplane, rhizoplane, and rhizosphere mycobiota of the garden strawberries for the actions of low molecular weight chitosan and high molecular weight one are determined. The differences in the influence of chitosanes of different biological origins on the group of micromycetes are shown. It is proved that the chitosan complex with sorbic acid has a prolonged antibacterial effect on *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and antifungal effects for *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp.

Key words: *Fragaria ananassa* Duch., elicitor, chitosan, defense mechanisms, secondary metabolites, ellagitannins, PR-proteins, phytopathogens.

Підписано до друку 26.03.21
Ум. друк. арк. 1,6
Наклад 100 прим.

Формат 60х84\16
Зам. № 210163

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041
тел.: 527-81-55