

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

СУБІН ОЛЕКСАНДР ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 632.1/.8:634.75-026.564

ДИСЕРТАЦІЯ

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

06.01.11 «Фітопатологія»

(біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання
на відповідне джерело

О. В. Субін

Науковий керівник
Мельничук Максим Дмитрович
доктор біологічних наук, професор
академік НААН України,

Київ – 2021

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 елісаторних властивостей і прямої біоцидної дії хітозану різного біологічного походження проти основних фітопатогенів суниці садової. Показано особливості фізіологічних реакцій модельних рослин суниці садової у відповідь на обробку розчинами хітозану.

Встановлено індукцію перебудови вторинного метаболізму рослин за впливу саліцилової кислоти, яка пов'язана з активним синтезом терпеноїдів і кон'югатів оксикоричних кислот з властивостями неспецифічних регуляторів росту. Експериментально визначено, що в умовах *in vitro* додавання саліцилової кислоти (25 мг/л) в живильне середовище сприяє утворенню пагонів і збільшенню загальної площі листків у рослин сортів Голосіївська рання та Аліна. При цьому у рослин-регенерантів посилюється обернена залежність ($r = -0,90$) між площею листків і вмістом у них флавоноїдів. Саліцилова кислота також активує синтез хлорогенової кислоти (ХК), її ізомерів та інших кон'югатів оксикоричних кислот. Показано, що індуковане підвищення концентрації ХК та інших кон'югатів оксикоричних кислот у тканинах листків суниці садової мало сортові відмінності і коливалося в межах 1,1–3,7 рази. 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).

Підтверджена ефективність застосування біопрепаратів проти збудника чорної кореневої гнилі під час адаптації рослин суниці садової до умов *ex vitro*. Біологічна ефективність біопрепаратів Фітоцид (*Bacillus subtilis*), Планриз

(*Pseudomonas fluorescens*) і Фітохелп (*Bacillus* spp.) проти *Rhizoctonia* spp. становила – 67,2 %, 57,7 і 62,3 % відповідно, тоді як найвищою характеризувався Триходермін (*Trichoderma* spp.) – 72,9 %. Водночас біопрепарати показали 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.

Досліджено основні фізико-хімічні та біохімічні показники і еліситорні властивості хітозанів, які отримано з плодових тіл *Agaricus bisporus* і комах *Hermetia illucens*. Встановлено, що грибний хітозан (НМХ) – низькомолекулярна форма полімеру зі ступенем деацетилювання 80,4 %. Тваринний хітозан (ВМХ) – високомолекулярна форма зі ступенем деацетилювання 90,7 %. Показано особливості моносхаридного складу хітозану, отриманого з плодових тіл *Agaricus bisporus*. У складі грибного хітозану виявлено 6 моноцукрів, серед яких ідентифіковано зокрема, рамнозу (16,4 %) і фукозу (6,7 %).

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 обробки. Визначено, що вплив хітозану на експресію генів PR-білків відбувається вже у перші години. Загалом відносний рівень експресії генів PR-білків за обробки рослин НМХ був вищим порівняно з ВМХ за винятком гена PR-1, експресія якого практично не змінювалася протягом експерименту. У рослин суниці садової за обробки НМХ 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. Щодо ендо- β -1,4-глюканази (PR-2b) – рівень експресії гену мав хвилеподібний характер з максимумом прояву на 48 год. Подібну експресію генів, пов'язаних із індукованою стійкістю рослин, з незначними відмінностями, спостерігали також і після обробки рослин високомолекулярним хітозаном.

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

У рослин *F. ananassa* виявлено природні циркадіанні ритми вмісту у листках фенольних речовин зі зниженням їхньої кількості у вечірні часи. Добові коливання загального вмісту фенольних речовин пов'язуються з полімеризацією й інтеграцією в клітинні стінки як складових компонентів лігніну і суберину.

Показано, що частка індивідуальних компонентів у загальному комплексі фенолів у листках є досить варіабельною ознакою. Так, коефіцієнт варіації загального вмісту фенолів у листках становить 50,1 %, при цьому в межах сорту найбільші відмінності встановлені для 2,3-S-гексагідроксидифеніл D-глюкози та елаготанінів. Також виявлено добову динаміку якісного і кількісного складу елаготанінів і флавоноїдів у листках суниці садової. Добові коливання індивідуальних фенольних сполук характерні для групи елаготанінів, а також для кемпферол-3-b-D-[6-O-(E)-кумароїл]-глюкопіранозиду (тілірозиду). Найстабільнішими показниками в листках цього сорту були вміст глікозиду кемпферолу і пентозид елагової кислоти.

Установлено відмінності реакцій відповіді рослин суниці садової на обробку низькомолекулярним і високомолекулярним хітозанами. За обробки рослин низькомолекулярним хітозаном у листках уже через 12 год кількість загальних фенолів і антиоксидантів збільшувалася в 1,9 і 3,2 рази відповідно. На відміну від низькомолекулярного хітозану, розчин високомолекулярного полімеру спричинював у листках різке зниження вмісту вільних і слабкозв'язаних з клітинними стінками фенольних сполук. Показано особливості накопичення елагової кислоти як одного із ключових компонентів у 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. Виявлена закономірність збігається з

реакцією рослин на хітозан, що свідчить про універсальність захисних реакцій незалежно від природи індукторів.

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, серед яких було ідентифіковано види *Fusarium* – збудники в'янення і корневих 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* траплявся після застосування низькомолекулярного хітозану через 48 год.

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 Стюгрена-Радулеску $\rho = 1,0$). Подібними виявилися угруповання мікроміцетів, які ізолювано з листків модельних рослин після обробки водою і високомолекулярним хітозаном (коефіцієнт спільності Стюгрена-Радулеску $\rho = 0,40$), а схожими – епіфітні мікобіоти після застосування низькомолекулярного (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 ($\rho = 0,40$).

Нами досліджено видовий склад ризоплани суниці садової після обробки водою і хітозанами. Так ізолювано та ідентифіковано 8 видів грибів, серед яких виявлено збудників хвороб кореневої системи, а саме *Cylindrocarpon destructans*,

Fusarium oxysporum, *Phoma herbarum* і *Rhizoctonia* sp. Висока частота трапляння 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 муковориві гриби надають перевагу субстратам з підвищеною вологістю. Однак *M. isabellina* не виділяли з ризоплани суниці садової, обробленої низько- і високомолекулярним хітозанами, що узгоджується з даними інших дослідників про те, що муковориві 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 досліджуваних розчинів. Водночас збудник чорної гнилі коренів і ягід *Rhizoctonia*, а також мікроміцет-антагоніст *Trichoderma viride* після обробки рослин розчинами хітозанів у ризоплані нами не виявлялося.

Визначено, що найчисельнішим серед мікобіоти ризосфери виявився гриб *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, проте 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.

Установлено зміну антибактеріальної активності і пролонгованої 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 (v/v –1 : 0,5) становив 6,4 мм.

Діаметр зони відсутності росту фітопатогенних культур під дією хітозану і сорбінової кислоти окремо на 3 добу коливався для ізолятів ІЗ FO-23 і ІЗ FS-14 в межах 4,9–8,5 мм, ІЗ AT-35 і ІЗ AT-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 ізолята ІЗ FO-21 спостерігали послаблення інтенсивності розвитку міцелію і спороношення. Таким чином, підтверджено ефективність застосування композицій на основі біополімерних комплексів глюкозамінів і природних консервантів для захисту рослин проти основних фітопатогенних мікроорганізмів.

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

Subin O. V. Induced resistance of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against main phytopathogens. Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation 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 dedicated to exploring the study of elicitor properties and the direct biocidal action of various biological origins chitosan against the main phytopathogens of strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.). The physiological responsiveness of the strawberry plants model system in response to treatment with chitosan solutions is shown.

The peculiarities of rearrangement and dynamics of secondary plant metabolism when exposed to salicylic acid, which is linked with the active synthesis of terpenoids and oxycinnamic acid conjugates with the nonspecific growth regulators properties, were studied. It has been established by experimental means that the addition of salicylic acid (25 mg / L) under *in vitro* conditions to the nutrient medium promotes the formation of shoots and an increase in the total leaf area in plants of varieties Holosiivska rannia and Alina. At the same time, in regenerated plants, the inverse relationship between leaf area and flavonoid content increases ($r = - 0.90$). Salicylic acid also stimulates the synthesis of chlorogenic acid, its isomers, and other oxycinnamic acid conjugates. The induced increase in the concentration of chlorogenic acid and other oxycinnamic acid conjugates in strawberry leaf tissues to have varietal differences and ranged from 1.1-3.7 times was shown. За рівнем індукованого підвищення концентрації цієї сполуки у порядку зростання досліджені сорти мають наступний ряд: Berehynia (1,07 times) < Fakel (1,57) < Dashenka kiivska (1,21) < Holosiivska rannia (1,64) < Alina (2,28 times).

The effectiveness of biopreparations against the pathogen of black rot in the adaptation of strawberry plants under *ex vitro* conditions was confirmed. Biological effectiveness of biopreparations Phytocid (*Bacillus subtilis*), Planriz (*Pseudomonas fluorescens*), and Fitohelp (*Bacillus* spp.) against *Rhizoctonia* spp.

stands at – 67,2 %, 57,7 i 62,3 % respectively. The highest biological efficacy had Viridin (*Trichoderma* spp.) – 72,9 %. At the same time, the biopreparations showed a significant growth-stimulating effect: the height of plant shoots increased by 40-55% and the total root length increased by 40-48%. The use of Phytocid, Fitohelp, and Planriz biopreparations increased the survival rate of plants at the stage of their adaptation by 18-26%, 13-16%, and 17-21% respectively.

The main physicochemical and biochemical parameters and elicitor properties of chitosan obtained from fruit bodies *Agaricus bisporus* and insects *Hermetia illucens* were studied. It has been found that mushroom chitosan (LMC) – is a low molecular weight form of the polymer with an 80,4 % deacetylation degree. Animal chitosan (HMC) – a low molecular weight form of the polymer with the 90,7 % deacetylation degree. The monosaccharide compositions of chitosan features of obtained fruit bodies *Agaricus bisporus* are shown. The mushroom chitosan composition depicts six identified monosaccharides among which rhamnose (16.4%) and fucose (6.7%) were identified in particular.

Peculiarities of the influence of chitosan of different biological origin on the relative expression of genes PR-proteins PR-1, PR-2a (β -1,3- glucanase), PR-2b (endo- β -1,4- glucanase) i PR-3 (chitinase) of *F. Ananassa* plants were revealed. The chitosan effect on the expression of PR-protein genes to occur in the first hours was determined. In general, the relative expression level of PR-protein genes was higher when the plants were treated with LMC compared to HMC, except for the PR-1 gene, the expression of which was virtually unchanged within the experiment. In strawberry plants, the relative number of β -1,3-glucanase (PR-2a) mRNA copies gradually increased in leaves after 1 h and reached its maximum by 3 days; for chitinase (PR-3) - sharply increased after 12 h. Concerning to endo- β -1,4-glucanase (PR-2b), the level of gene expression had a wave-like character with a 48 hours maximum manifestation. Similar gene expression related to induced plant resistance with minor differences after plants high-molecular-weight chitosan treatment was also detected. The high-performance liquid chromatography method (HPLC) experimentally detected 9 major phenolic

compounds, in particular, hydrolyzed tannins, derivatives of gallic and ellagic acids, and flavonoids in *F. ananassa* leaves.

Natural circadian rhythms of phenolic substances leaf content with a decrease in their amount in the evening time were found in *F. ananassa* plants. The diurnal fluctuations in the total content of phenolic substances are associated with polymerization and integration into cell walls of constituents such as lignin and suberin. It is shown that the ratio of individual components in the total complex of phenols is quite variable in leaves. For instance, the coefficient of variation of the total phenols content in leaves is 50.1%, with the greatest differences within a variety established for 2,3-S hexahydroxydiphenyl D-glucose and ellagitannins. The daily dynamics of the qualitative and quantitative composition of ellagitannins and flavonoids in the leaves of strawberry was also found. The diurnal considerations of individual phenolic compounds are characteristic of the ellagitannin group as well as the kaempferol-3-b-D- [6 O- (E)-coumaroyl]-glucopyranoside (tiliroside). The most stable indicators in this leaf variety were the content of glycoside kaempferol and pentoxide of allegoric acid.

The differences in strawberry plants reactions to treatment with low- and high-molecular-weight chitosan were studied. The number of total phenols and antioxidants in leaves increased by 1.9 and 3.2 times correspondingly, after 12 h of treatment with low-molecular-weight chitosan. In contradistinction to low-molecular-weight chitosan, the high-molecular-weight polymer solution caused a sharp decrease in the content of free and weakly bound to cell walls phenolic compounds in leaves. There are shown the peculiarities of ellagic acid accumulation as one of the key components in the system of primary defensive reactions of plants against pathogens. The daily fluctuations in the content of phenolic compounds, in particular, ellagitannins and flavonoids in the leaves of *F. ananassa* as one of the main mechanisms of plant adaptation to adverse factors were revealed. The identification of meaningful patterns coincides with the plant reaction to chitosan, indicating the universality of protective reactions regardless of the inducers nature.

The dynamics of mycobiota of phylloplane, rhizoplane, and strawberry rhizosphere due to low- and high-molecular-weight chitosan species composition was determined. The differences in the effect of chitosan of different biological origins on the grouping of micromycetes were shown. The *Fusarium* species - causative agents of wilt and rot in strawberries, were identified among them. Species of *Alternaria tenuissima* (92,3 %), *Penicillium* sp. (76,9 %), and *Fusarium* sp. (69,2 %) were heavily concentrated on strawberry leaves. The *Hemicolia fuscoatra* fungus (50.0%) was characterized by a high level of infestation of strawberry leaves in the control; after treatment with low- and high-molecular-weight chitosan – *Alternaria tenuissima* (44,4 i 37,5 %), *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. (37,5 %). The *Aspergillus nidulans* micromycetes and *Nigrospora oryzae* phytopathogen were isolated from strawberry leaves in the control group, the вид *Trichoderma viride* occurred after 48 hours of low molecular weight chitosan application. The highest species diversity of epiphytic micromycetes (11 species) was found on the control plants leaves. It was proved that treatment with low-molecular-weight chitosan substantially differs the species composition of the mycobiota of strawberry phylloplane from the control group of plants (Stogran-Radulesku Index $\rho = 1.0$). The groupings of micromycetes that were isolated from the leaves of model plants after treatment with water and high-molecular-weight chitosan (Stogran-Radulesku Index $\rho = 0.40$) were similar. The epiphytic mycobiota appeared similar after the application of low-molecular-weight chitosan (exposure 12 h) and high-molecular-weight chitosan after 24 h. There is no difference in the species composition of micromycetes isolated leaves from the treated surface with high-molecular-weight chitosan at different exposures ($\rho = 0.40$).

There was investigated variety composition of strawberry rhizoplane after water and chitosan treatment, hence 8 species of fungi were identified and isolated, among which were found pathogens of root diseases system: *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma herbarum*, and *Rhizoctonia* sp. The high frequency of occurrence was characteristic of the *C. destructans* 85,7 % and *Penicillium* sp. 57,1 % types. The highest level of strawberry roots invasion (50.0%) by the mucor fungus *Mortierella isabellina* was observed 48 h after plant water treatment. The reason for

this is that mucor mushroom prefers high humidity substrates. However, *M. Isabellina* has not been isolated from strawberry rhinoplasty treated with low- and high-molecular-weight chitosan, consistent with the data of other researchers that mucosa mushrooms are susceptible to chitosan with different molecular weights. A high level of occupancy was characterized by *C. destructans* i *F. oxysporum* (37,5 %) species after 12 and 48 h low-molecular-weight chitosan treatment, respectively. Notably, *Fusarium* was isolated 48 h after application of both solutions to strawberries. At the same time, the agent of berry black rot *Rhizoctonia* and antagonist micromycete *Trichoderma viride* after treatment of plants with chitosan solutions were not detected in rhizoplane.

It was determined that *Penicillium* sp. was the most numerous in mycobiota rhizosphere, which amounted to 47.4 thousand CFU/g of soil in total, after 12 and 48 h water treatment 20.7- 22.7 thousand CFU/g of soil respectively. The application of low-molecular-weight chitosan has greatly influenced its abundance, which was 4.9 and 6.3 thousand CFU/g of soil 12 and 48 h after application, correspondingly. This species was not isolated 12 h after treatment with high-molecular chitosan, but its number was 18.7 thousand CFU/g of soil after 48 h. In general, penicillins were characterized by a decreasing tendency in the soil with various forms of chitosan after treatment. There was established a change in antibacterial activity and prolonged action of chitosan, sorbic acid, and their complex concerning different isolates and strains of phytopathogenic bacteria. There was determined the bacteriostatic effect of a mixture and sorbic acid of chitosan on PSP-31 and PSP-33 bacterial isolates. The biocidal effect of chitosan (the diameter of the growth suppression zone was 17.6 mm) and the bacteriostatic effect of sorbic acid was detected in PP-42 and PSP-35 isolates. The diameter of the no-growth zone of *C. michiganisens* in the environment of chitosan and sorbic acid complex (v/v 1: 0.5) was 6.4 mm on the 6th day.

The diameter of the no-growth zone of phytopathogenic cultures under the action of chitosan and sorbic acid varied for FO-23 and FS-14 isolates from 4.9 to 8.5 mm, AT-35 and AT-37 from 6.8 to 14.1 mm individually on the 3rd day. The substance mixture inhibited mycelium growth, with the diameter of the no-growth zone

measuring at 8.4-10.8 and 9.6-18.6 mm, respectively, testifying to the additive effect of substance interaction on phytopathogenic micromycetes. The FO-21 isolate showed a weakening of mycelial development and sporulation intensity. So, the efficiency of using compositions based on biopolymer complexes of glucosamines and natural preservatives for plant protection against the main phytopathogenic microorganisms is also confirmed.

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

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., за ред. О. Л. Кляченко. Біополімерні комплекси та гетероциклічні сполуки в системі захисту рослин: монографія. Київ: ФОП Ямчинський, 2020. 227 с. (*Здобувачем взято участь у проведенні наукових досліджень, підготовці матеріалів до 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 НУБіП 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 (48). С. 26–33. (*Здобувачем проведено постановку експерименту, визначено кількість фенолів, флавоноїдів, пластидних пігментів, проведено біотест, 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. V. 50. № 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. V. 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. V. 101 (3). P. 227–237. (Здобувачем визначено фізико-хімічні властивості хітозанів, проведено постановку експерименту, підготовлено матеріали до друку).

Статті у 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.** Науково-методичні рекомендації "Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин". Київ, 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*. IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», м. Київ, 21–22 травня 2015: тези доповіді. Київ, 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 культуре *in vitro*. VIII Международная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», г. Минск, 28–30 октября 2015: тезисы доклада. Минск, 2015. С. 116. *(Здобувачем поставлено експеримент з дослідження впливу салицилової кислоти на морфогенні процеси суниці садової, підготовлено матеріал до друку)*

13. Субін О. В. Мікроклональне розмноження високопродуктивних сортів суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.). IV Міжнародна науково-практична конференція молодих учених «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур». Центральне, 21 квітня 2016: тези доповіді. с. 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. IV International scientific conference of young researches «Biotechnology: science I

practice». 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).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	21
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Система стійкості рослин до біотичного стресу.....	29
1.1.1. Роль еліситорів в активації індукованої стійкості рослин проти фітопатогенів	32
1.1.2. Роль саліцилової кислоти в системі захисту рослин.....	34
1.1.3. Екзогенні індуктори синтезу та функції PR-білків рослин	36
1.2. Роль вторинних метаболітів рослин в системі стійкості проти збудників хвороб та шкідників	38
1.3. Значення хітозану в системі захисту рослин	45
1.3.1. Еліситорна активність хітозану	47
1.3.2. Біоцидна активність хітозану	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	52
2.1. Підбір модельних об'єктів та постановка експерименту.....	52
2.2. Фізико-хімічні методи досліджень.....	53
2.3. Молекулярно-генетичні методи досліджень	55
2.4. Біотехнологічні методи досліджень.....	57
2.5. Фізіологічні та біохімічні методи досліджень	58
2.6. Мікробіологічні методи досліджень	61
2.7. Статистичні методи досліджень	62
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ І КОМПЛЕКСНИХ БІОПРЕПАРАТІВ НА ФЕНОЛЬНИЙ СИНТЕЗ ТА СТІЙКІСТЬ МОДЕЛЬНИХ КУЛЬТУР ПРОТИ ЗБУДНИКА ЧОРНОЇ КОРЕНЕВОЇ ГНИЛІ.....	64
3.1. Специфіка морфогенезу і метаболіки модельних культур в умовах <i>in vitro</i>	64

3.2. Вплив екзогенної саліцилової кислоти на морфогенез і антиоксидантний потенціал рослин-регенерантів в культурі <i>in vitro</i>	67
3.3. Ризогенез та адаптація рослин-регенерантів модельних культур до умов <i>ex vitro</i>	75
3.4. Дослідження ефективності застосування біопрепаратів при адаптації <i>Fragaria ananassa</i> Duch. до умов <i>ex vitro</i>	79
РОЗДІЛ 4. ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ PR-БІЛКІВ РОСЛИН ЗА ДІЇ ХІТОЗАНІВ ГРИБНОГО І ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ	85
4.1. Визначення фізико-хімічних характеристик хітозанів грибного і тваринного походження	85
4.2. Підбір і перевірка праймерів для дослідження генів PR-білків рослин.....	93
4.3. Вплив препаратів хітозану різного біологічного походження на експресію генів PR-білків модельних культур.....	98
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКА ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИН МОДЕЛЬНИХ КУЛЬТУР ЗА ДІЇ НА ОБРОБКУ ХІТОЗАНАМИ ГРИБНОГО І ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ	104
5.1. Вплив хітозанів на динаміку синтезу та акумуляцію фенольних сполук в листках <i>Fragaria ananassa</i> Duch.....	104
5.2. Особливості реалізації системної стійкості у модельних культур після обробки хітозаном.....	115
5.3. Дослідження впливу хітозану на морфо-фізіологічні показники рослин-регенерантів і синтез фенолкарбонових кислот у листках <i>Nicotiana tabacum</i> L.	122
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ ХІТОЗАНУ ГРИБНОГО І ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ВИДОВИЙ СКЛАД МІКОБІОТИ МОДЕЛЬНИХ КУЛЬТУР.....	132
РОЗДІЛ 7. АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ХІТОЗАНУ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОЗИЦІЙ НА ЙОГО ОСНОВІ	145
7.1. Антибактеріальна та антифунгальна дія хітозану та сорбінової кислоти	145

7.2. Антимікробна дія біологічно активної композиції на мікроорганізми-антагоністи.....	151
7.3. Антимікробні властивості біологічно активної композиції та екзометаболітів штамів-антагоністів	155
ВИСНОВКИ	160
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	162
ДОДАТКИ.....	196

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АА – антиоксидантна активність;

АФК – активна форма кисню;

БАП – 6-бензиламінопурин;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія;

ВМХ – високомолекулярний хітозан;

ГК – гіберелова кислота;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ДФПГ – 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразиловий радикал;

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота;

ІМК – індоліл-3-масляна кислота;

Кр – каротиноїди;

МКР – мікроклональне розмноження;

ММ – молекулярна маса;

НМХ – низькомолекулярний хітозан;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

СБК – сорбінова кислота;

СД – ступінь деацетилювання;

СК – саліцилова кислота;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

ФАЛ – фенілаланін-аміак-ліаза;

ХК – хлорогенова кислота;

Хл *a* – хлорофіл *a*;

Хл *b* – хлорофіл *b*;

ЦПМ – цитоплазматична мембрана;

ChI – хітозан, отриманий з плодових тіл *Agaricus bisporus*;

ChII – хітозан, отриманий з комах *Hermetia illucens*;

ISR (induced systemic resistance) - індукована системна стійкість;

MS – живильне середовище за прописом Мурасіге-Скуга;

PR-білки (pathogenesis-related proteins) - білки, пов'язані з патогенезом;

SAR (systemic acquired resistance) - системна набута стійкість.

ВСТУП

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 еліситорів, 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 (Минибаева, 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 – еліситорів, які відіграють роль первинних сигналів і запускають процеси індукції та регуляції фітоімунітету (Hahn, 1996; Doughari, 2015). Серед них велику увагу привертають біогенні еліситори, 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 еліситор – рослина, еліситор – патоген, еліситор – 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 еліситорів і з’ясувати їхню роль у формуванні системи індукованої стійкості суниці садової проти основних фітопатогенів.

Для вирішення поставленої мети 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 високоефективної рідинної хроматографії, тонкошарової хроматографії, високоефективної 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 гомогенез 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 плодових тіл 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 плодових тіл *Agaricus bisporus* вперше отримано і досліджено склад моноцукрів хітозану, що має вагоме практичне 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. Частину 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, развития 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Система стійкості рослин до біотичного стресу

Протягом життєвого циклу рослини піддаються значній кількості біотичних та абіотичних стресових факторів. Відповіді рослинного організму на негативні зовнішні чинники дуже складні і включають фізіологічні зміни на тканинному і клітинному рівнях [103, 156]. Розпізнавання ефекторів та сигнальних молекул є одним із способів реалізації власних захисних систем рослинного організму, індукторами яких є абіогенні та біогенні хімічні сполуки, що викликають у рослин відповідні реакції на стрес [295]. Зазвичай це супроводжується посиленням синтезом і накопиченням вторинних метаболітів або утворенням нових сполук та комплексів [245]. Індуктори можуть генеруватися зовнішнім стимулюванням (екзогенні) або внаслідок фізичного та/або хімічного руйнування клітинної стінки рослин (ендогенні) [167, 289]. Після сприйняття молекулярного стимулу активуються сигнальні канали трансдукції, які викликають збільшення рівня активних форм кисню (АФК) [213], стимулюють утворення фітоалексинів, посилення міцності клітинної стінки рослин продуктами фенілпропаноїдного синтезу, відкладанням калози, активації захисних ферментів та накопичення PR-білків, серед них деякі мають антимікробні властивості [125, 304, 313].

Одним з найбільш шкодочинних та універсальних біотичних стресових чинників, яким піддаються рослини, є патогенні мікроорганізми, віруси, бактерії, ооміцети, найпростіші та гриби (аскоміцети, базидіоміцети) [97]. Проте комахи і нематоди також часто викликають у рослин схожі на патогенний вплив реакції [92]. Відомо, що механізм індукції захисного механізму для певного господаря практично не залежить від типу інфікуючого патогену, хоча час і ступінь вираженості відповідної реакції при цьому відрізняються. Кожний індивідуальний захисний механізм ефективний лише проти декількох специфічних патогенних організмів [87]. Фенотиповими маркерами стійкості рослин до потенційних патогенів є посилення лігніфікації, потовщення

клітинних стінок, а також, іноді, локальні некрози, типові для реакції надчутливості. Індукована стійкість може проявлятися і без видимих симптомів. Біохімічними маркерами індукованої стійкості є запуск кіназного каскаду - ланцюг фосфорилування МАП-кіназ, що активує внутрішньоклітинні сигнальні каскади, в тім числі іонні потоки через плазматичну мембрану, підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, АФК і посилення транскрипції генів захисту (до 25% всіх генів рослин) [41, 86, 88, 177].

Таблиця 1.

Перелік механізмів індукованого захисту рослин від патогенів [92]

Механізм захисної реакції	Індуктори	Спектр дії
PR-білки: PR-1; β -1.3-глюканаза, хітиназа	Саліцилова кислота, жасмонова кислота	Антимікробні білки зі специфічною активністю
Дефенсини	Бурштинова Кислота	Антимікробні білки
Фітоалексини	Патогенні полісахариди	Антимікробні вторинні метаболіти
Лігнін	Патогени, еліситори	Фізичний бар'єр (потовщення клітинної стінки)
Калоза, β -1.3-глюкан	Патогени, механічні ушкодження	Фізичний бар'єр (потовщення клітинної стінки)
Білки клітинної стінки	Патогени, еліситори	Фізичний бар'єр
Реакція надчутливості	Продукти Avr-генів; активні форми кисню	Обмеження росту патогенів, формування вторинних сигналів

Індукована стійкість рослин до хвороб має системний характер і проявляється при контакті з патогенами протягом усього або більшої частини онтогенезу і за своєю природою близька до природних імунних реакцій [207, 297]. Виділяють дві форми індукованої стійкості: системна набута стійкість (systemic acquired resistance - SAR) та індукована системна стійкість (induced systemic resistance - ISR), які відрізняються за характером виникнення (еліситором та запуском регуляторних шляхів) [67, 309]. SAR розвивається системно в тканині при первинному зараженні патогеном [152]. При цьому

авірулентні збудники, які активують індуковану стійкість за допомогою еліситорів, з розвитком реакції надчутливості, є потужними індукторами SAR [45, 282]. Системну набуту стійкість індукують антипатогенні білки, що супроводжується запуском сигнального шляху СК та відповідних каскадних реакцій у системі захисту проти патогену [236]. Іншим шляхом запуску SAR є активація жасмонатного сигнального шляху, що виражається в посиленому синтезі жирних кислот, утворенні жасмонатів, а також інших регуляторів, зокрема гідролізованих та конденсованих танінів у боротьбі проти патогенних грибів та фітофагів [124, 230, 239]. У багатьох дослідженнях SAR показано при взаємодії рослина-патоген [276, 290], де вона типово характеризується обмеженням росту збудника та пригніченням розвитку симптомів захворювання порівняно з інфікованими тим самим збудником рослинами [181]. Хоча SAR є ефективною проти широкого кола патогенів, включаючи віруси, бактерії, гриби та ооміцети [205], однак вона є переважно ефективною проти патогенів з (напів-) біотрофним способом існування [305].

Цілком ймовірно, що крім SAR і ISR існують інші форми індукованої стійкості, які варіюють залежно від регуляторів та ефекторів (саліцилова кислота, етилен, жасмонат, абсцизова, арахідонова кислоти та інші, поки що не вивчені рослинні регулятори) [135, 309]. На думку С.Л. Тютерева [87], індукована системна стійкість є феноменом, який полягає в тому, що стійкість до патогена індукується локальним зараженням, обробкою метаболітами мікроорганізмів або структурно різноманітними біологічно активними речовинами органічного чи неорганічного походження.

Очевидно, захисні механізми є багатошаровими, дублюють один одного і ускладнюються в процесі сполученої еволюції комплексу живих організмів. Ці вроджені різноманітні захисні системи збереглися і можуть бути активовані та посилені патогенами, фітофагами, а також компонентами, які не є протеїнами або простими неорганічними і органічними речовинами. Компоненти, асоційовані з захистом, відрізняються різноманітністю структури і складністю [206, 268].

1.1.1. Роль еліситорів в активації індукованої стійкості рослин проти фітопатогенів

Взаємодія між патогенами і рослинами поділяється на дві основні категорії: перша - сумісні, що призводять до перенесення і поширення патогена та розвитку симптомів захворювання у рослини (чутливий господар інфікується вірулентним патогеном); друга - несумісні, виражається в дуже обмеженому рості патогена, відсутності симптомів захворювання і часто локальних некротичних пошкодженнях рослинних тканин [173, 191, 303]. В цьому випадку взаємодії не відбувається і патоген називають авірулентним, а господаря стійким [92]. Наскільки успішно рослина і потенційний патоген розпізнають один одного, вірогідно, визначає остаточний результат такої взаємодії. Розрізняють два основних рівня специфічності, що обумовлює або стійкість, або чутливість рослин до патогенів [113, 248, 298]. Встановлено, що при контакті з рослинами клітини патогенні мікроорганізми виділяють певні сполуки, які забезпечують їх проникнення в тканини рослин [109, 231, 334]. Ідентифікація патогенів супроводжується метаболічним репрограмуванням з накопиченням великої кількості антимікробних речовин [138]. Індуктори стійкості або еліситори – це сполуки які запускають сигнальні шляхи активації захисних генів, метаболічних захисних реакцій та формування стійкості до збудників захворювань різної етіології. Ця стійкість проявляється в локалізації патогена в процесі інвазії, блокуванні його подальшого проникнення та розповсюдження і розмноження в рослинах [88]. Еліситори відіграють роль первинних сигналів і запускають складну мережу процесів індукції та регуляції фітоімунітету [84]. Еліситори здатні викликати сигнали подібні до взаємодій «рослина-патоген» і, таким чином, викликати індукцію захисних механізмів, які будуть стримувати інвазії патогенних грибів, бактерій та вірусів в рослинний організм [32, 146]. Це проявляється в синтезі захисних білків, нелетких рослинних антибіотиків - фітоалексинів, у виділенні антипатогенних летких сполук тощо [1, 166, 291].

Еліситори можуть бути продуковані зовнішніми факторами (екзогенні), або згенеровані внаслідок фізичного та/або хімічного руйнування клітинної

стілки рослини (ендогенні). Після розпізнавання елісатора починається запуск низки процесів біохімічних змін для індукції захисних механізмів клітинами-господарями. Ці процеси включають зміни в іонопроникності плазматичних мембран, активації мембрано-зв'язуючих ферментів, активації кіназ, фосфатаз, фосфоліпаз та утворенні сигнальних молекул, включаючи активні форми кисню (АФК) [167, 289]. Елісатори бувають неспецифічними, які спричинюють відповідно запуск захисних реакцій як в стійких, так і в сприйнятливих видах і сортах рослин, і специфічними, що викликають захисні і сприйнятливі реакції тільки в стійких сортах рослин [83, 94].

У ролі елісаторів часто виступають біополімери клітинних стінок патогенів та рослин-господарів (хітин, глюкан, білки грибів, пектин, геміцелюлози, стресові гормони рослин) або продукти їх ферментної деградації, а також ненасичені жирні кислоти, які містяться в спорах грибів, білки джгутиків бактерій, флагеліни, гідрофобні харпіни, які є частиною фімбрій поверхні бактерій, білки вірусів - біогенні елісатори; іони важких металів, деякі гербіциди, фенольні сполуки - абіогенні елісатори [2, 23, 123, 134, 157, 201, 235].

Молекули, які асоціюються з ушкодженням, виникають перш за все в апопласті, що дозволяє цим клітинам передавати їх іншим клітинам і тканинам [88]. Активація клітинного сигналу відбувається, зазвичай, після взаємодії елісатора з гетеродимером, який складається з R-білка і протеїнкінази (оскільки з мембраною пов'язано кілька типів кіназ). Розвиток цього процесу в одному випадку призводить до передачі сигналу з поверхні плазматичної мембрани в ядро, активації певних ділянок хроматину і включенню надчутливості - програми її швидкого самознищення, в іншому - до розвитку тією чи іншою мірою сумісності [40, 71, 72, 147, 158, 249, 272, 339]

Незважаючи на те, що кожен елісатор має свій механізм розпізнавання, загальним для них залишається комплекс реакцій фосфорилування, в результаті якого залишок фосфорної кислоти передається на внутрішню ділянку рецептора, активуючи асоційований з рецептором фермент [114, 331]. Рецептори, незалежно від природи зв'язуються з відповідним елісатором, мають загальну у будову:

ділянку, розташовану поза клітиною, внутрішню мембранну і ділянку, яка знаходиться в цитоплазмі. Зовнішній N-кінець рецептора специфічний до елісатора, а внутрішній C-кінець - до асоційованого з рецептором ферменту, що визначає одну із сигнальних систем придатну для взаємодії [41].

Одними із основних індукторів стійкості рослин є грибні глюкани, хітин та його похідні, які здатні індукувати експресію генів стійкості і сприяти посиленому біосинтезу фітоалексинів. Ці речовини є нетоксичними і в дуже малих концентраціях виступають в ролі сигнальних молекул [39]. Вивчення механізму дії олігосахаридів на рослини дозволило встановити, що спектр реакцій залежить від концентрації і структури досліджуваних речовин. Окремі олігосахаридні елісатори проявляють найвищу активність за різних концентрацій. Наприклад, індукція синтезу захисних сполук (хітинази) в культурі клітин рису була максимальною за концентрації N-ацетілхітогексаози 1 мкг/мл, тим часом як для досягнення того ж ефекту за використання ламінарингексаози (фрагмента (β -1,3- глюкана), потрібна була в 10 разів більша концентрація [192].

Проте, зважаючи на велику кількість елісаторів залишається відкритим питання дослідження всіх механізмів запуску захисних реакцій залежно від типу елісатора та підбір оптимальних концентрацій і композицій елісаторних сполук для забезпечення максимально ефективної стратегії захисту рослин проти патогенів.

1.1.2. Роль саліцилової кислоти в системі захисту рослин

Саліцилова кислота присутня в рослинах усіх родин та видів і, натепер, розглядається як ендогенний регулятор росту і розвитку, а також, як стресовий гормон захисту рослин від абіотичних та біотичних стресів. Обробка рослин саліциловою кислотою захищає багато видів однодольних і дводольних рослин від вірусних, грибних і бактеріальних хвороб [137].

СК міститься в клітинах рослин у вільній, глікозидній та метильованій формах, а також у глюкозоефірах та кон'югатах амінокислот [203] і синтезується

двома незалежними шляхами: фенілпропаноїдним (у цитоплазмі з феніланіну) та ізохоризматним (у хлоропластах) [120, 203, 321]. Вона приймає участь у процесах дихання, руху проростків, проростання насіння, регулює ріст коренів, листків, впливає на швидкість дозрівання плодів та є посередником сигнальної трансдукції молекулярних стимулів у відповідь на біотичний та абіотичний стреси [210, 240]. Однією із основних її функцій є регуляція морфогенних процесів та внутрішньоклітинний сигналінг рослин [44, 84, 150, 168, 233]. У відповідь на дію патогенів СК стимулює генерування активних форм кисню, накопичення захисних PR-білків, активує ФАЛ, реакцію надчутливості рослин, бере участь у функціонуванні НАДФН-оксидазної системи [60, 122, 150, 271]. Завдяки можливості транспорту по флоемі вона здатна передавати сигнали у віддалені від ураження патогеном органи рослин [285].

Доведено, що одним з ключових елементів у реалізації ефектів СК, як сигнальної молекули є білок NPR1 [256], який утворюється в рослинних тканинах в незначних кількостях, проте при інфікуванні патогенами або обробці екзогенною СК його кількість значно зростає [122, 241]. СК пригнічує активність каталази, яка розщеплює пероксид водню, сприяючи його накопиченню. Він індукує утворення некрозів, тобто підсилює реакцію надчутливості, що є показником підвищення стійкості до патогенів. Пероксид водню, активуючи синтез СК, призводить до ще більшого зростання кількості активних форм кисню і, як наслідок, - посиленню надчутливості. При інгібуванні процесу некрозоутворення саліцилова кислота переходить у зв'язаний стан і взаємодіючи з глюкозою утворює глікозиди [23, 52, 61].

Екзогенна саліцилова кислота, проникаючи в клітини, активує весь комплекс протеїнажно-інгібіторної системи рослин, що сприяє посиленню адаптаційної відповіді на несприятливі фактори зовнішнього середовища і підвищує імунітет рослин [75]. Екзогенна СК включається в сигнальний шлях і метаболізм її ендогенної форми та індукує в рослинах всі типи стійкості до біотрофних патогенів, в тім числі реакцію надчутливості і локальної стійкості, характерну для расово-специфічної (R-генної) стійкості, а також системну

набуту стійкість до грибів з біотрофним типом живлення, вірусів, бактерій та ооміцетів [17, 88]. За дії патогенів, еліситорів або екзогенного пероксиду водню концентрація СК збільшується в десятки разів, після чого поступово знижується, що пояснюється її переміщенням із клітини в апопласт, перетворенням на леткий метилсаліцилат із подальшою дифузією в повітря, де він бере участь у дистанційному сигналінгу [66].

1.1.3. Екзогенні індуктори синтезу та функції PR-білків рослин

PR-білки (*pathogenesis-related proteins*) або білки, пов'язані з патогенезом та синтезовані в рослинній клітині за умови проникнення патогена. Вперше ці білки виявлено у рослин *Nicotiana tabacum* L., які проявляють реакцію надчутливості у відповідь на інокуляцію вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) [56, 212, 311]. Пізніше різні PR-білки виявлено в інших видах рослин і показано їх індукцію у відповідь на ураження рослин грибами, вірусами і віроїдами та проникнення нематод і комах [155, 312, 313].

Перші дослідники дійшли висновку, що всі PR-білки мають певні загальні властивості: вони розчинні тільки в кислому середовищі (рН - 3), наявні в екстрацелюлярній рідині та стійкі до деградації протеолітичними ферментами [132, 200]. Проте пізніше з'ясовано, що деякі PR-білки (наприклад, томату і картоплі) виявилися не кислими, а основними, які до того ж руйнуються протеолітичними ферментами. Згодом у *Nicotiana tabacum* L. виявлено інший набір PR-білків, які локалізовані у вакуолях, та показана їх конституційна експресія у коренях. Основні білки індукуються в листках при обробці їх етиленом і в результаті механічних ушкоджень, тоді як кислі білки за цих умов не експресуються [196, 281, 313].

Всі PR-білки *Nicotiana tabacum* L. поділяють на декілька груп. При цьому кожен кислий екстрацелюлярний білок має цифру, що позначає групу, а також різні букви: «а», «b», «с» і т. д. Нумерація ґрунтується на відносній мобільності при електрофорезі у неденатуруючих умовах. Різні білки, позначені одним і тим же номером (наприклад, PR-1a, PR-1b, PR-1c), серологічно споріднені, мають

близьку молекулярну масу і часткову подібність за амінокислотною послідовністю. Бурхливий розвиток досліджень PR та PR-подібних білків в останні 20 років тісно пов'язаний з їх антимікробною або інсектицидною активністю і розвитком лабораторних методів аналізу, включаючи отримання трансгенних рослин з генетичними конструкціями різних PR-генів [85, 126, 156, 311].

Натепер виділяють до 17 груп або типів PR-білків (від PR-1 до PR-17). У літературних джерелах згадується, що PR-білки містяться у міжклітинному просторі, плазмодесмах, цитоплазмі і вакуолях клітин, зустрічаються у ксилемному соці та не транспортуються по рослині [90, 155, 170, 311, 313]. В інфікованих клітинах рослини синтез даних білків проходить *de novo*. Як правило, PR-білки переміщуються в апопласт і діють кооперативно, руйнуючи клітинну стінку патогена. Серед великої кількості різноманітних PR-білків найбільш вивченими є білки трьох груп: PR1, PR2 і PR3 [87, 88, 126, 170].

Серед білків, що накопичуються в листках *Nicotiana tabacum* L. у відповідь на ВТМ, виявлено кислі форми PR-1a, PR-1b і PR-1c, які мають подібні молекулярну масу, амінокислотну послідовність та серологічну спорідненість [56, 299]. Крім *Nicotiana tabacum* L. ці білки виявлено в інфікованих рослинах картоплі, кукурудзи, ячменю та томатів. Широке розповсюдження білків типу PR-1, як у однодольних, так і у дводольних рослин, підтверджує їх важливу роль у відповіді рослин на стрес. Накопичення PR-білків при інфікуванні патогенами, що викликають некроз і набуття рослинами стійкості до наступного зараження, дозволили припустити, що PR-білки групи 1 приймають участь в системній набутій стійкості [85, 88, 170]. Синтез PR-1 білків (Bol, Linthorst, Cornelissen, 1990), перевищують за швидкістю утворення інших груп PR-білків, і можуть становити до 2% від загальної кількості білків у інфікованій рослині [112, 132]. PR-1 білки токсичні для багатьох грибів і вірусів [57, 65, 226, 234, 267, 283, 307, 333].

Ферменти β -1,3-глюканаза та хітинази (групи PR-2 і PR-3 відповідно), розщеплюють полісахариди β -1,3-глюкан і хітин [95]. Синтез цих ферментів у

відповідь на зараження також свідчить про їхні зв'язки з захисними реакціями [118, 286]. Хітин і β -глюкан - основні компоненти клітинних оболонок грибів, з хітину побудовані стилети комах і нематод. Наразі гени, які відповідальні за синтез хітинази і β -глюканази, широко використовуються в генно-інженерних конструкціях з метою створення трансгенних рослин, стійких до хвороб і шкідників [169, 302]. Білки PR-2 є β -1,3-ендоглюканазами, накопичуються навколо місця інфікування і є медіаторами, що забезпечують взаємодію інфікованих клітин зі здоровими та мають також фунгіцидну активність [90, 196, 201].

1.2. Роль вторинних метаболітів рослин в системі стійкості проти збудників хвороб та шкідників

Вторинні метаболіти рослин виконують певну кількість функцій протягом їх життєвого циклу, що можуть бути класифіковані, як посередники у взаємодії рослина-навколишнє середовище, рослина-комаха, рослина-мікроорганізм та рослина-рослина [183].

Проста класифікація вторинних метаболітів включає три основні групи [107, 232, 237]:

- терпени (леткі речовини, серцеві глікозиди, каротиноїди та стероли);
- феноли (фенолкарбонові кислоти, флавоноїди, кумарини, лігнани, таніни, стилібени, лігнін);
- азотовмісні сполуки (алкалоїди, глюкозинолати).

Різні класи цих речовин є видоспецифічними і виявляються лише в декількох видах у межах філогенетичної групи або можуть бути унікальними лише для одного виду [35, 96, 275]. Вміст вторинних метаболітів визначається активністю їх синтезу, ефективністю транспорту і впливом ендо- та екзогенних факторів у рослинних органах і тканинах. Дані ознаки є генетично детермінованими, знаходяться під контролем розвитку організму і максимально реалізуються в тих чи інших зовнішніх умовах. Проте на сьогодні відомо тільки невелику кількість генів, що відповідають за їх синтез. На генетичному рівні

найбільш вивченим шляхом є формування флавоноїдів та антоціанів [144, 163, 252, 319].

Синтез і накопичення вторинних метаболітів залежить від стадії розвитку рослини, її віку та фізіологічного стану. Найбільша їх кількість накопичується у багатьох видів рослин у фазі цвітіння, тоді як у фазі плодоношення спостерігається значне зменшення. Проте загальних закономірностей щодо змін вторинного метаболізму на різних етапах росту і розвитку рослин не існує, що викликано регуляцією активності генів, які кодують ферменти їх біосинтезу, транскриптомними факторами та транспортними білками [117, 143, 182, 323]. Біосинтез вторинних метаболітів у онтогенезі залежить від виду рослини, зовнішніх факторів, стадії розвитку, ролі метаболітів у фізіологічних процесах [20, 21].

Утворення вторинних метаболітів є важливою складовою рослинних захисних систем, конституційного синтезу фітоантиципінів та індукованого синтезу фітоалексинів. Вони відіграють роль антифідантів, репелентів, аттрактантів, що регулюють відносини рослин з консументами, забезпечують процеси розмноження та розповсюдження діаспор. Крім того, вторинні метаболіти характеризуються унікальними властивостями і використовуються як лікарські засоби, харчові добавки, інсектициди, ароматизатори, натуральні барвники тощо [15, 185, 264, 316].

Метаболіти синтезуються і локалізуються лише в спеціальних субклітинних компартментах [15, 37]. Тому тканинно- та клітинно-специфічна локалізація буде залежати від полярності сполуки, зокрема її ліпофільності або гідрофільності. Ліпофільні сполуки можуть знаходитися в мембранах органел або в ендоплазматичному ретикулумі (ЕРС), хоча деякі речовини, як наприклад алкалоїд берберин, накопичується в специфічних везикулах. Більшість гідрофільних сполук акумулюється у вакуолях, внутрішніх частинах органоїдів, в цитозолі та міжклітинному просторі (апопласті) і, як правило, знаходяться у вигляді прекурсорів (неактивних речовин-попередників), активація яких проходить фізико-хімічним або ферментативним шляхом. Їх біосинтез може

відбуватися в цитозолі, органоїдах та ЕРС, тоді як транскрипційний контроль цих сполук проходить в ядрі [104, 139, 178]. Метаболіти, що локалізовані в мембранах пластид та мітохондріях є важливими для первинних метаболітів, як приклад: електрон-транспортні ланцюги та поглинання світла [275, 317]. Рослини здатні виділяти леткі сполуки, що притягують комах для запилення та зоофагів для захисту проти природних шкідників. Через кореневу систему рослини також можуть виділяти нелеткі речовини в ґрунт, змінюючи тим самим ризосферу, що призводить до інгібування росту інших конкуруючих рослин [44, 63, 142, 178].

Речовини вторинного метаболізму різних груп у рослинному світі розподілені нерівномірно, наприклад, фенольні сполуки мають загальне поширення в рослинах, тоді як алкалоїди утворюються лише у 10-15% судин рослин. Крім того, окремі представники цього класу синтезуються в дуже вузького кола рослин. Беталаїни виявлено тільки у рослин одного порядку, а сірковмісні і ціаногенні глікозиди зустрічаються лише в рослин декількох родин [9].

Фенольні сполуки – це велика група вторинних метаболітів рослин, які є важливим компонентом у природних механізмах стійкості проти негативних факторів довкілля [254]. Поліфеноли - важливі посередники в адаптаційних відповідях, пристосуванні та виживанні рослин під впливом хронічних чи гострих негативних чинників [20]. Концентрація фенольних сполук у рослині широко варіює протягом життєвого циклу, а також є різною в органах та тканинах [320].

Біосинтез фенольних сполук впливає із шикіматного шляху синтезу (рис.1), який поєднаний з синтезом індолів, деяких алкалоїдів та беталаїнів. Попередником похідних коричної кислоти і флавоноїдів є фенілаланін, що під дією ключового ферменту цієї частини шляху біосинтезу фенілаланін-аміакліази (ФАЛ) перетворюється в коричні кислоти. Корична кислота є попередником синтезу полімерів, таких як лігнін, що синтезуються з коричних альдегідів і відповідних спиртів – монолігнолів [178, 189, 280, 318]. Флавоноїди

і стилбени (резвератрол, виділений з винограду) також формуються за цим шляхом біосинтезу [162, 255]. Активація коензиму-А відіграє важливу роль у цьому ланцюгу біосинтезу, корична кислота активується, утворюючи з коферментом А ефіри, які є попередниками синтезу флавоноїдів і кумаринів.

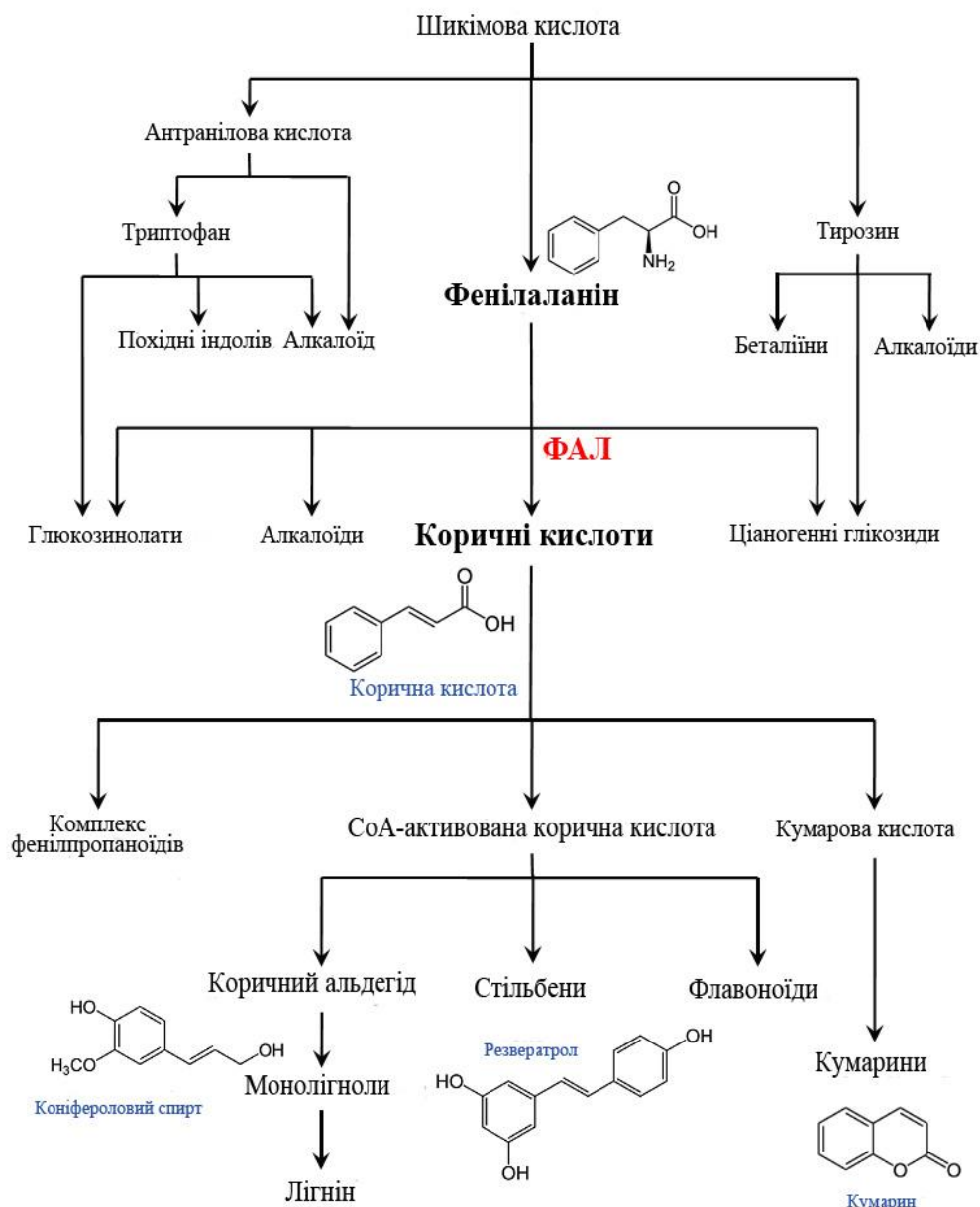


Рис 1. Схема синтезу деяких фенольних сполук з фенілаланіну за допомогою фенілаланін-аміак-ліази (ФАЛ) [178]

Основні властивості природних фенольних сполук можна розділити на три групи: фізичні, хімічні та біологічні. До фізичних - відносять здатність надавати колір, смак і запах та поглинати ультрафіолетове світло. До хімічних - перш за

все відноситься антиоксидантна, радикалзв'язуюча та комплексоутворююча властивості. Використовуючи ці властивості фенольні сполуки здатні гасити окиснювальний «вибух», нейтралізувати активні радикали і виводити з організму важкі метали і радіоактивні елементи, тобто захищати рослини і живі організми від дії несприятливих чинників. Їх біологічні властивості мають дуже широкий спектр застосування, зокрема рістрегулюючу здатність в процесах росту, коренеутворення та дозрівання плодів [20, 36, 70, 91].

Відомо, що основним місцем локалізації фенольних сполук усередині клітини є вакуоля [22, 29, 69, 310]. Проте в молодих клітинах вакуоля не виражена і, ймовірно, фенольні сполуки майже повністю концентруються в пластидах. В будь-якому випадку, хлоропласти є не тільки визначальним центром біосинтезу фенольних сполук, а й важливим місцем накопичення кон'югованих фенольних сполук [22].

Фенольні сполуки різноманітні як за своєю структурою, так і за функціональними властивостями в рослинному організмі. Практично всі фенольні сполуки відіграють важливу захисну роль в реакціях рослинного організму на всіх рівнях. Встановлено, що рослинні клітини реагують на механічні ушкодження або проникнення патогенів підвищенням рівня активності ФАЛ, 4-гідроксилази транс-коричної кислоти, пероксидази та інших ферментів [197], що супроводжується “спалахом” новоутворення фенольних сполук. З'єднуючись з полімерами клітинних стінок нефенольної природи, лігнін та оксикоричні кислоти сприяють їх ущільненню і “зшиванню”. Це призводить до зупинки інвазії патогену та неконтрольованій втраті води. Варто зазначити, що посилення процесів лігніфікації є однією із стратегій метаболічної адаптації до дії стрес-факторів різної етіології [179, 336].

Найпростішими сполуками фенілпропаноїдного синтезу є фенолкарбонові кислоти. Їх розділяють на два класи: похідні бензойної кислоти, зокрема, галова, саліцилова, протокатехова і похідні коричної кислоти, такі як кумарова, сінапова, кавова і ферулова. Кавова кислота є найрозповсюдженішою фенольною кислотою, міститься в багатьох фруктах і овочах та проявляє

здатність до етерифікації з хінною кислотою, з утворенням хлорогенової кислоти - основної фенольної сполуки в каві. Іншою поширеною фенольною кислотою є ферулова кислота, яка присутня в злаках і етерифікується до геміцелюлози в клітинній стінці [129, 130]. Фенольні кислоти з о-дифенольною структурою здатні утворювати хелати з іонами металів, що має важливе значення для функціонування біологічних систем. Крім того, вони легко окиснюються до відповідних хінонів, що призводить до утворення окиснювально-відновних систем і дозволяє полімеризувати високомолекулярні компоненти [325].

Оксикоричні кислоти приймають активну участь в обміні речовин і є біогенетичними попередниками переважної більшості інших фенольних сполук. Крім того, у рослин оксикоричні кислоти представлені також у вигляді ефірів або полімерів, найвідомішим з яких є куркумін, що складається з двох молекул ферулової кислоти. Оксикоричні кислоти можуть виникати у тканинах низки тварин у процесі метаболізму поліфенолів [31].

Флавоноїди характеризуються хімічним різноманіттям і широким розповсюдженням у рослинних організмах. Різноманіття флавоноїдів обумовлено наявністю вільних радикалів в ароматичних кільцях А і В, ступенем глікозилування, місцем приєднання та природою вуглеводневих залишків, величиною окиснювальних циклів цукрів, конфігурацією глікозидних зв'язків і характером з'єднання глікозидної частини з агліконом [26]. Вони поділяються на наступні підгрупи: антоціани, проантоціанідіни, флавоноли, флавони, флавани, флаванони, дигідрофлавоноли, халкони, дегідрохалкони, ізофлавоноли, аурони, тощо [82].

Флавоноїди є одними з найважливіших хімічних сполук у рослинних організмах, завдяки їх участі в багатьох ключових процесах росту і розвитку. Вони не тільки беруть участь в пігментації, репродукції рослин, але і відіграють помітну роль в процесах клітинної сигналізації та можуть слугувати як месенджери хімічних сигналів [82, 172, 326].

Біологічна дія флавоноїдів у рослині пов'язана з регуляцією окиснювально-відновних процесів, транспорту ауксинів, стабілізацією клітинних мембран,

модуляцією активності ферментів та рецепторів [55]. Флавоноїди, які мають о-гідроксили в ядрі В (кверцетин, мерицитин, лютеолін) виступають синергістами ауксинів, стимулюючи ріст рослин унаслідок інгібування ІОК-оксидази, тоді як флавоноїди з п-гідроксилами (апигенін, нарингенін) є кофакторами ІОК-оксидази і виступають в ролі антагоністів ауксинів [55, 175, 229, 244, 253, 300].

Флавоноїди, які беруть участь в захисних механізмах рослин, можна підрозділити на дві групи: конститутивні та індуковані. Індуковані сполуки починають синтезуватися рослиною у відповідь на фізичне ушкодження, інфекцію або стрес, конститутивні - під впливом стресового фактору [238, 306, 332]. Конститутивні флавоноїди - природні речовини, які синтезуються в рослинних тканинах протягом їх нормального розвитку і часто локалізовані в стратегічно важливих місцях рослинного організму, де вони можуть відігравати роль сигнальних молекул або безпосередньо приймати участь в захисті [279].

Одна з найважливіших їх функцій - це участь в окиснювально-відновних процесах. У присутності оксидоредуктаз, а саме поліфенолоксидази, флавоноїди окиснюються киснем повітря і перетворюються у відповідні хінони, які відновлюються атомами водню дихального субстрату та переходять в доступні форми для дії поліфенолоксидази. Таким чином, система “флавоноїд-поліфенолоксидаза” слугує переносником атомів водню на кінцевих етапах процесу дихання. Незалежно від участі в цьому процесі, наявність такої системи дає можливість рослинній клітині і надалі окиснювати низку сполук (амінокислоти, аскорбінову кислоту, цитохром с, яблучну і лимонну кислоти, поліфеноли з лінійним розташуванням оксигруп) вже неферментативним шляхом [46, 55]. Згідно літературних даних, антиоксидантні властивості флавоноїдів засновані на їх здатності бути “пастками” для вільних радикалів, а також хелатувати іони металів, які беруть участь в перекисному окисненні [82, 161, 204].

Фенольні сполуки - одні з найважливіших неферментативних елементів системи захисних механізмів рослин і є не лише показником стресових реакцій рослин на різний рівень світла або мінералів, але і ключовими посередниками у

боротьбі зі шкідниками [209, 318]. Функції фенолів у захисних механізмах варіюють від заздалегідь утворених або індукованих фізико-хімічних бар'єрів від патогенів до сигнальних молекул, які беруть участь у локальних та системних сигналах для індукції експресії відповідних генів. Захисні функції не обмежуються окремими фенілпропаноїдними сполуками, адже їх можуть виконувати, як прості оксикоричні кислоти і монолігноли, так і більш складні флавоноїди, ізофлавоноїди, стильбени тощо [145].

1.3. Значення хітозану в системі захисту рослин

Інтерес до хітозану та його похідних пов'язаний з їх унікальними фізіологічними та екологічними властивостями, такими як біосумісність з тканинами людей, тварин і рослин, біодеструкція, фізіологічна активність при відсутності токсичності, здатність до селективного зв'язування важких металів і органічних сполук, до волокно- і плівкоутворення та низки інших властивостей [62, 140, 225, 270, 327].

Хітозан – це природний лінійний полісахарид, який складається із двох субодиниць: D α, 1-4 D-глюкозаміну (GlcN) та N-ацетил-D-глюкозаміну (GlcNAc) з різними композиціями цих двох мономерів [116, 131, 186]. Хітозан містить в собі 3 реактивні функціональні групи: аміногрупи та первинний і вторинний атом вуглецю в позиціях C-2, C-3 та C-6 відповідно [153, 165]. Відомо, що аміногрупи хітозану проявляють властивості слабких основ, які обумовлюють поведінку хітозану в розчині як поліелектроліта і, відповідно, залежність конформаційного стану макромолекул від ступеня протонування в розчинах з різною іонною силою. Інша характерна властивість хітозану - здатність його функціональних груп до утворення водневих зв'язків, як внутрішньомолекулярних, що стабілізують конформаційну структуру, так і міжмолекулярних [5, 25, 89].

Хітозан - це продукт деацетилювання другого за поширеністю природного амінополісахарида - хітину, який отримують переважно з панцирів ракоподібних, екзоскелету комах, клітинних стінок грибів і дріжджів [14]. При

цьому, враховуючи специфіку отримання даного біополімеру з різних природних джерел, необхідно звернути увагу, на притаманну йому структурну неоднорідність за багатьма параметрами [73]. Тому, виробництво хітозану грибним міцелієм натеper заслуговує на особливу увагу завдяки його значним перевагам, зокрема контрольованому процесу бродіння, тоді як, отримання біополімеру із ракоподібних великою мірою залежить від сезону, географічної локації та видового складу [102, 324]. Крім того, кількість неорганічних речовин у грибних міцеліях нижча порівняно з ракоподібними відходами, що не вимагає етапу демінералізації [301]. Характеристики хітозану ракоподібних можуть сильно варіювати залежно від фізико-хімічних властивостей, тоді як грибний хітозан відносно сталий, внаслідок контрольованих умов процесу бродіння [257, 266].

Широке застосування хітозану та його похідних, можна пояснити унікальними фізико-хімічними та біологічними властивостями. Джерело, ступінь деацетилювання та молекулярна маса дуже важливі для реалізації багатьох функціональних властивостей хітозану [101, 335]. Позитивний заряд хітозану сприяє його проникненню через клітинні мембрани і щільні шари епітелію, забезпечуючи хорошу адгезію. Полікатіонна природа хітозану дозволяє йому взаємодіяти з різними негативно зарядженими природними полімерами, такими як ліпіди [98, 328], білки [108, 216], ДНК та РНК [218, 222, 292] через утворення електростатичних, гідрофобних, Ван-дер-Ваальсових та водневих зв'язків [160, 194, 274]. Маючи хелатні властивості, хітозан здатний зв'язувати перехідні метали. Наявність в його складі реактивних аміно- та гідроксильних груп обумовлює високу здатність до хімічної модифікації [73]. Відомо, що хімічна модифікація хітозану змінює електростатичний заряд і проникність полімеру, не порушуючи структуру його полімерного ланцюга та дозволяє створювати нові і покращені його властивості, такі як біосумісність плівок та ін. Хімічна модифікація хітозану відбувається за допомогою хімічних зв'язків або зшивання синтетичних біополімерів, перехресного поєднання з різними фізичними чи хімічними реагентами, випромінюванням, фотохімічною

і плазмоіндукованою гідрофобізацією завдяки реакції алкілування, поверхневим покриттям мікро- або наносфер з біосумісними синтетичними полімерами та імобілізованими ферментатами [133, 199].

Ключовими параметрами біологічної активності хітозану є молекулярна маса і ступінь його деацетилювання. Як і в багатьох інших полімерів, молекулярна маса хітозану коливається в широких межах від 1-2 кДа в олігомерах до декількох сотень кДа у високомолекулярних формах [51, 68, 88, 156, 220, 258, 294]. Низькомолекулярні форми хітозану здатні проникати в клітини та індукувати репрограмування процесів метаболічного синтезу. Високомолекулярний хітозан утворює плівку на поверхні інфікованих рослинних тканин і запобігає подальшому поширенню патогенів [48]. Повністю ацетильований (хітин) і деацетильований (поліглюкозамін) хітозан не проявляють біологічної активності, оскільки для цього важливим фактором є співвідношення амінних та ацетильованих груп. Найбільшу активність має хітозан зі ступенем деацетилювання від 70 до 90% [24, 74, 243].

Використання хітозану в системі захисту рослин ґрунтується на його здатності індукувати захисні механізми у тканинах оброблених рослин, а також на прямій біоцидній дії проти фітопатогенів [19, 148]. Досить перспективним є створення та використання на практиці композиційних препаратів хітозану з сигнальними молекулами, що мають високу швидкість та інтенсивність індукування в рослинах системних захисних реакцій [81, 193].

1.3.1. Еліситорна активність хітозану

Хітозан, як сигнальна молекула підвищує продуктивність сільськогосподарських культур шляхом індукції та регулювання захисних, симбіотичних, ростових і процесів розвитку у рослинах [68, 154]. Він стимулює життєво важливі процеси на кожному рівні біологічної організації, починаючи з фізіологічних і біохімічних процесів окремих клітин і тканин до молекулярного рівня, змінюючи експресію генів [215].

При обробці хітином та хітозаном, як відповідь захисних механізмів рослин запускаються реакції лігніфікації, зміна потоку йонів, цитоплазматичне окиснення, деполяризація мембран, фосфорилізація протеїнів, активація хітинази і глюканази, (зокрема β 1,3-глюканаза є PR-білками 2 типу) синтезом фітоалексинів, генерацією активних форм кисню, біосинтезом жасмонової кислоти та експресією унікальних «ранніх» захисних генів у відповідь на стрес як у однодольних, так і в дводольних рослин. Крім того, хітозан здатний індукувати формування калози, інгібіторів протеїнази та синтез фітоалексинів в багатьох дводольних видів [127, 159, 186, 220].

Даний біополімер активує октодеканоїдний шлях, що полягає в серії метаболічних перетворень в якому жасмонати синтезуються шляхом окиснення ліноленової кислоти. Цей шлях захисної відповіді рослин індукується олігосахаридами, які здатні активувати H^+ -АТФази, деполяризувати біологічні мембрани та запускати каскади сигнальних реакцій [156]. Показано, що здатність хітозану зв'язувати супероксид- і гідроксил-радикал збільшується при зниженні молекулярної маси [330]. Сульфатовані і карбоксиметильовані похідні хітозану проявляють більшу антиоксидантну активність, ніж немодифікований хітозан [284, 308].

У дослідженнях Guo et al. та Hadwiger показано активацію більше 20 генів, пов'язаних з патогенезом, зокрема: β -глюканази, хітинази та інші. Крім того, хітозан здатний активувати гени пов'язані з метаболізмом [176, 180]. У дослідженнях Ramonell et al. показано, що в рослинах *Arabidopsis thaliana* L., оброблених хітозаном, рівень експресії 61 гену підвищувався втричі порівняно з контролем [265]. В роботі Akimoto Tomiyama et al. у рослин рису після обробки хітоолігосахаридами відбувається індукція 161 та супресія 93 генів [99].

Встановлено, що обробка 0,4% розчином хітозану цитрусових індукує експресію низки важливих генів, пов'язаних з фенілпропаноїдним синтезом, зокрема кофeyл-СоА-О-метилтрансферази, який бере участь в синтезі лігніну [127] та вплив хітозану на фенілпропаноїдний синтез у рослин томатів [128]. У рослин *Vitis vinifera* L. підвищувався синтез стильбенів від 1,6 (резвератрол) до

3,8 разів (піцеїд) після обробки розчином хітозану. Крім того, спостерігалось збільшення пентациклічних тритерпеноїдів урсолата, олеаноата і беталіната в 1,25, 1,47 та 3,68 рази відповідно [221]. Інші дослідження показали, що за обробки хітозаном листків винограду спостерігалася overекспресія супероксидизмутази та фенілаланін-аміак-ліази [106].

Вплив хітозану як еліситора на патогенні організми відбувається внаслідок взаємодії з патогеном через хелатування металів або зв'язування з негативно зарядженими компонентами клітинної стінки мікроорганізмів [261] або індукцією імунітету внаслідок високої спорідненості з трансмембранними рецепторами рослин [258]. Необхідно зазначити, що препарати хітозану характеризуються структурною неоднорідністю, яка впливає на його імуномодуючі властивості.

1.3.2. Біоцидна активність хітозану

Біоцидній активності хітозану присвячено велику кількість експериментальних робіт [214, 262]. Пригнічуючи ріст прокаріотів, міцеліальних і дріжджеподібних грибів, хітозан чинить менший вплив на клітини ссавців [49, 50, 269]. Механізм дії хітозану на патогенну мікрофлору, ймовірно, пов'язують з порушенням цілісності їх зовнішньої мембрани, до складу якої входять ліпополісахариди, глікопротеїди, фосфоліпіди. Порушення захисної мікробної оболонки сприяє більшій уразливості мікроорганізмів і підвищенню їх чутливості до антибіотиків [13]. Вірогідно, що антибактеріальні властивості полімеру пов'язані, в першу чергу, з його впливом на клітинні стінки мікроорганізмів [49, 50].

Біоцидну дію на грам-негативні бактерії полікатіонний хітозан проявляє завдяки здатності зв'язуватися з ліпосахаридом, який входить до складу бактеріальної мембрани і, створюючи негативний заряд запобігає проникненню гідрофобних антибактеріальних молекул [217]. Хітозан проникає через клітинну стінку і взаємодіє з фосфорними залишками ліпідів цитоплазматичної мембрани (ЦПМ), що призводить до порушення її проникності. В результаті взаємодії

хітозану з ЦПМ спостерігається вихід із клітини в середовище компонентів цитоплазми, що поглинають ультрафіолет - білків і коферментів [214]. Іноді під впливом хітозану вихід білків не спостерігається, що пов'язують з утворенням на поверхні клітини хітозанової плівки, яка блокує проникнення цитоплазматичних компонентів назовні, і перешкоджає надходженню всередину необхідних для життєдіяльності мікроорганізму речовин [49, 50, 121, 208].

Механізм антифунгальної дії хітозану на сьогодні залишається маловивченим. За аналогією з бактеріями, дію хітозану пов'язують з порушенням структури клітинної стінки, що викликає зміни морфології міцелію, розміру і форми спор [187], цілісності грибною цитоплазматичної мембрани, що призводить до виходу з клітин цитоплазматичного вмісту [337]. Оскільки дріжжеподібні і міцеліальні гриби відносяться до еукаріотичних мікроорганізмів, ймовірно, протигрибна дія хітозану матиме і свої особливості механізму дії порівняно з прокаріотами. Хітозан, на відміну від класичних речовин з фунгістатичними властивостями, не має єдиної мішені для своєї дії, а його антигрибний ефект є сукупністю декількох можливих механізмів, які в комплексі призводять до загибелі клітин мікроорганізмів [48].

За результатами дослідження процесу інгібування хітозанами із різною молекулярною масою 9 фітопатогенів *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Colletotrichum capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae*, *Sphaceloma ampelinum* встановлено, що низькомолекулярні біополімери проявляють більшу ступінь інгібування міцелію, ніж високомолекулярні форми [184, 287].

Вивчення біоцидної дії хітозану на *Rhizopus stolonifer* показало, що низькомолекулярні форми ефективніше пригнічують міцеліальний ріст, а високомолекулярні – утворення спор та їх проростання [188]. Низкою авторів встановлено, що хітозан здатний стримувати ріст, спричиняти ушкодження клітинної структури *Botrytis cinerea* та утворювати непроникний бар'єр навколо клітини незалежно від ММ біополімера при однаковому СД (80%) [251, 263,

329]. Verlee et al. стверджують, що хітозани з більшою ММ та більшим низьким СД (<85%) проявлять високу фунгістатичну активність [315]. Однак, протилежні результати представлено в роботі Карпової, в якій показано, що низькомолекулярні форми хітозану (СД 85%) повністю пригнічують ріст *Botrytis cinerea* на відміну від високомолекулярних форм з СД 60 та 90% [195].

Незважаючи на те, що вивченню біоцидної активності хітозану присвячено багаточисельні роботи, механізми антибактеріальної і антигрибної дії цього біополімера на клітинному і молекулярному рівнях залишаються недостатньо вивченими [50, 68]. Вочевидь, що на ефективність біоцидної дії хітозану впливають його фізико-хімічні параметри, а саме молекулярна маса та ступінь деацетилювання, проте складно провести оцінку оптимальних показників цих параметрів через розбіжності в способах їх визначення [19]. Для посилення біоцидних властивостей хітозанового полімеру отримують його похідні. Наявність реакційноздатних функціональних груп в хітозані забезпечує можливість подібної хімічної модифікації полімеру. Похідні хітозану як біоцидного агента отримують з метою підвищення власне біоцидних властивостей речовини або забезпечення кращої розчинності полімеру, особливо при нейтральному і лужному значеннях рН середовища [16, 49].

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Підбір модельних об'єктів та постановка експерименту

В якості модельних культур використовували рослини *Nicotiana tabacum* L. (сорт Гавана) та *Fragaria ananassa* Duch. (сорт нейтрального дня Аліна, оригінатор: Мельничук М. Д.; середньоранній сорт Берегиня, ранньостиглий сорт Голосіївська рання, середньопізній сорт Дашенька київська, пізньостиглий сорт Факел, селекціонер: Шеренговий П. З.; оригінатор: Національний університет біоресурсів і природокористування України. Сорти внесені до державного реєстру сортів придатних до поширення в Україні та отримані за допомогою мікроклонального розмноження і адаптовані до умов *ex vitro*. Після адаптації рослини вирощували на спеціальних торф'яних субстратах (Domoflor Міх, Литва) за сталої температури +25 °C та 16 годинному фотоперіоді.

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. Хітозани 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.

Узагальнена схема досліджень представлена на рис. 2.1.



Рис. 2.1. Узагальнена схема досліджень.

2.2. Фізико-хімічні методи досліджень

Характеристика форм та екстракція хітинового матеріалу. Перша форма хітозану грибного походження отримана нами методом ферментативного гідролізу з плодових тіл *Agaricus bisporus* (ChI), друга - з комах *Hermetia illucens* (ChII). Крім того, в роботі використані комерційні форми хітозану: Хітозан I – низькомолекулярний хітозан (Sigma-Aldrich), Хітозан II – хітозан з молекулярною масою 100,0-300,0 кДа (Acros Organics), Хітозан III – високомолекулярний хітозан (Sigma-Aldrich). Після обробки лугом та кислотою хітиновий матеріал одержували за модифікованою нами методикою Rane and Hoover [266]. Ліофілізований порошок перемішували в 1M NaOH (v:v 1:40) і кип'ятили за 95 °C протягом 30 хв для відділення білків, лужнорозчинних полісахаридів та невеликих молекул (моносахариди, феноли, амінокислоти та солі). Осад центрифугували за 12000 g 20 хв за температури 22 °C. Лужнорозчинний матеріал двічі промивали деіонізованою водою та 95%

етанолом. Після остаточного центрифугування нерозчинний залишок виморожували та висушували. Для одержання нерозчинного неочищеного грибного хітину, осад промивали 2% оцтовою кислотою (v:v 1:100) протягом 6 год за 95 °С. Очищений кислотою осад центрифугували (за 12000 g, +22 °С протягом 20 хв) і промивали деіонізованою водою та 95% етиловим спиртом. Хітин залишався нерозчинним залишком (неочищений хітин), а хітозан, екстрагували оцтовою кислотою і осаджували з супернатанту за рН 10.

Вимірювання ступеню деацетилювання хітозану. Ступінь деацетилювання різних форм хітозанів визначали кислотно-лужним титруванням. Висушений хітозан ($m = 0,2$ г) розчиняли у 20 см^3 0,1М НСІ та 50 см^3 дистильованої води. Отриманий розчин титрували 0,1М NaOH з використанням автоматичної бюретки (точність $0,01 \text{ см}^3$). За допомогою рН-метра, замірювали зміни рівня рН після виходу кожних $0,5 \text{ см}^3$ титрованого розчину. Ступінь деацетилювання (DA, %) визначали за формулою:

$$DA = 2,03 \cdot \frac{(V_2 - V_1)}{m + 0,0042 \times (V_2 - V_1)}, \quad (2.1)$$

де m - маса зразка;

V_1, V_2 – об'єм 0,1М розчину NaOH витраченого на титрування, який відповідає точкам перегику;

0,0042 – коефіцієнт різниці молекулярних мас мономерів хітину та хітозану;

2,03 – коефіцієнт молекулярної маси мономеру хітину.

Молекулярну масу хітозану визначали за кінематичною в'язкістю розчинів хітозану з наперед відомою концентрацією. 1% розчини хітозанів, розчинені в оцтовій кислоті пропускали через віскозиметр ВПЖ-1 з діаметром капіляра 0,86 мм. Як контроль використовували 1% оцтову кислоту. Кінематичну в'язкість рідини (V , $\text{мм}^2/\text{сек}$) підраховували за формулою:

$$V = \frac{g}{9,807} \cdot T \times K, \quad (2.2)$$

де K - стала віскозиметра - 0,03169;

T - час витікання рідини. с;

g - прискорення вільного падіння в місці вимірювання в м/с^2 ($g = 9,81$), використовуючи конвертер величин UnitConverter.

2.3. Молекулярно-генетичні методи досліджень

Виділення РНК з модельних культур. Вибірка в межах кожного дослідженого генотипу становила двадцять зразків. РНК виділяли зі свіжих зелених листків методом фенол-хлороформної екстракції з подальшою сорбцією на оксиді силіцію (SiO_2) із застосуванням набору реагентів Рибо-Сорб (Амлісенс, Росія). Як біопробу використовували 100 мкл супернатанту, отриманого на етапі пробо підготовки. Подальший протокол виділення РНК відповідав рекомендаціям виробника реактивів. Якість і концентрацію РНК оцінювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі NanoDrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific, США*).

Синтез кДНК проводили за допомогою реакції зворотної транскрипції використовуючи набір реагентів RevertAid та First Strand cDNA Synthesis Kit Random Hexamer Primer (*Thermo Fisher Scientific, США*). Синтез кДНК здійснювали у загальному об'ємі 20 мкл упродовж 60 хв за температури $42\text{ }^\circ\text{C}$ (відповідно до інструкції фірми-виробника).

Проведення ПЛР. ПЛР проводили на ампліфікаторі “GeneAmp 2400” (*Applied Biosystems, США*) у наступному температурному режимі: 4 хв за $94\text{ }^\circ\text{C}$; 34 цикли: 20 с за $94\text{ }^\circ\text{C}$, 20 с за $55 - 65\text{ }^\circ\text{C}$ (залежно від локусу), 30 с за $72\text{ }^\circ\text{C}$; 5 хв за $72\text{ }^\circ\text{C}$. Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. Tag-полімерази (*Thermo Fisher Scientific, США*), 30–70 нг геномної ДНК, 1,5 – 2,0 мМ MgCl_2 та по 0,2 – 0,5 мкМ праймерів.

Характеристики досліджуваних праймерів

Ген	Сиквенс праймерів 5'→ 3' (Прямий/Зворотній)	Кількість циклів	Tm
<i>N. tabacum</i>			
Actin	GCCGTGGTGGTGAAAGAG	36	58
	TGGACTCTGGTGATGGTGTC		
PR-1	ACCTGGAGGATCATAGTTGC	38	58
	GATGTGGGTTCGATGAGAA		
PR-2a	TGGCTAAGAGTGGAAGGT	36	55
	GCACCATTTGTTGCTCCT		
PR-2b	TGTTGATGCCATTGTTGGCTTC	37	55
	CCCTACAGATGCCCCTCCTG		
PR-3a	TGGTACCAGTGGCGATACCAC	37	58
	AGTCGCCGGGGCTACCTT		
PR-3b	GATGACACCACAGGACAACAAG	38	58
	TCCACTGCGTCATTCCGTC		
<i>F. ananassa</i>			
Actin	TCGGTGACGAGGCTCAATC	36	59
	GGCCTCAGTTAGGAGAACTGG		
PR-1	ACATGGGATGCCAATCTAGC	38	58
	CCACAGGTTACAGCAGATG		
PR-2a	TATGGACGAAACGGTGACAA	38	57
	AGGGTTGCACATTTTTCTGG		
PR-2b	GCTAAACGCCAGGTGGATTA	36	57
	AAATGCATCCGAGCTATTGG		
PR-3	ACCAAGTTCAGCTCGCAGAT	38	58
	TCCTAATGGCCTTGAAGTGG		

Tm – температура відпалу праймерів

Проведення ПЛР в режимі реального часу. ПЛР 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 °C; 42 цикли: 20 с за 95 °C, 20 с за 60 °C (зняття сигналу), 30 с за 72 °C. Реакційна суміш на один зразок загальним об'ємом 20 мкл містила: 10 мкл 2x 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 [219]. Специфічність ампліфікації в експериментах визначали за наявністю одиничного піку на кривій плавлення.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації. Відсутність неспецифічних продуктів ПЛР перевіряли у 2% агарозному гелі. Молекулярний розмір продуктів ампліфікації визначали за маркером GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва) за використання програмного пакету Quantity One Software4.6.3 (BioRad, США).

2.4. Біотехнологічні методи досліджень

У якості стерилізуючих агентів використовували 1% розчин гіпохлориту натрію, 20% розчин перекису водню, 0,1% розчин сулеми та 1% розчин нітрату срібла (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Стерилізуючі агенти та їх концентрація

№	Стерилізуюча речовина	Концентрація, %	Час стерилізації, хв
1	Гіпохлорит натрію (NaClO)	1,0	10
2	Пероксид водню (H ₂ O ₂)	20,0	15
3	Сулема (HgCl ₂)	0,1	10
4	Нітрат срібла (AgNO ₃)	1,0	10

Стерилізацію проводили за наступною схемою: спочатку частини рослин-донорів промивали 20 хв. у мильному розчині, постійно перемішуючи, потім у стерильних умовах занурювали на 30 с в 70% етиловий спирт з подальшим перенесенням в стерилізуючий агент та відмиванням в трьох порціях дистильованої води по 10 хв. у кожній. Експлантати поміщали на модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга (MS) [242]. В дослідженнях використано 6 варіантів з додаванням різних комбінацій і концентрацій ауксинів, цитокінінів та гіберелінів : варіант №1 – 0,5 мг/л БАП (6-Бензиламінопурин), варіант №2 – 1,0 мг/л БАП, варіант №3 – 1,5 мг/л БАП, варіант №4 – 0,5 мг/л БАП та 0,75 мг/л

ІМК (β -індолілмасляна кислота), варіант №5 – 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ІМК, 0,1 мг/л ГК (гіберелова кислота), варіант №6 – 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІМК. Культивування проводили у термальній кімнаті за температури + 25-26°C, відносній вологості повітря 70-75%, освітленості 2,0 - 3,0 клк та за 14-годинного фотоперіоду [58, 59].

Для індукції ризогенезу використовували три варіанти живильних середовищ: 1 варіант – безгормональне живильне середовище MS, 2 варіант – $\frac{1}{2}$ MS з додаванням активованого вугілля, 3 варіант – $\frac{1}{2}$ MS з додаванням 0,5 мг/л ІМК.

На етапі адаптації до умов *ex vitro* рослини- регенеранти зі сформованою кореневою системою, що мала по 4-6 коренів довжиною 20-25 мм, обережно відмивали від залишків агару дистильованою водою і промивали 1%-ним розчином перманганату калію. Корені занурювали в розчини біопрепаратів на дві години. Використано 4 варіанти біопрепаратів: 1 - 1,0 мл/л Фітоцид (на основі бактерій *Bacillus subtilis*, «БТУ-центр», Україна); 2 - 35 мл/л Планриз (на основі бактерій *Pseudomonas fluorescense*, ТОВ «Центр Біотехніка», Україна); 3 - 1,5 мл/л ФітоХелп (на основі бактерій *Bacillus* spp., «БТУ-центр», Україна); 4 - 8 мл/л Триходермін (на основі грибів *Trichoderma* spp.) Як контроль, використовували рослини, корені яких замочували у воді протягом аналогічного часу. Рослини висаджували в стерильний торфовий субстрат і субстрат з використанням торфу, перліту та піску у співвідношенні 3:1:1, накривали скляними циліндрами і культивували в регульованих умовах світлової кімнати за фотоперіоду 16 год., температури за 25±2°C та освітленості 2,5 тис. лк. Визначали кількість і довжину стебел та коренів через 14 діб адаптації (трикратна повторність).

2.5. Фізіологічні та біохімічні методи досліджень

Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів. Загальний вміст хлорофілів (Хл *a* та Хл *b*) і каротиноїдів (Кр) у листках суниці садової визначали за допомогою спектрофотометра Optizen Pop (Південна Корея). Листки суниці садової екстрагували в 100% ацетоні. Вимірювання концентрації пігментів без

попереднього розділення проводили на довжинах хвиль: для X_{La} – 662 нм, X_{Lb} – 644 нм, Kp – 440 нм. Каламутність розчину на 720 нм. Показники спектрофотометра при 720 нм віднімали від показників на інших довжинах хвиль. Розрахунки вмісту пігментів (C) проводили за наступними формулами [47]:

$$C_a = 9,784 \times D_{662} - 0,990 \times D_{644}, \quad (2.3)$$

$$C_b = 21,426 \times D_{644} - 4,650 \times D_{662}, \quad (2.4)$$

$$C_a + C_b = 5,13 \times D_{662} + 20,44 \times D_{644}, \quad (2.5)$$

$$C_{Kp} = 4,695 \times D_{440} - 0,268 \times C_{a+b}; \quad (2.6)$$

де, C_a – концентрація X_{La} , мг/л; C_b – концентрація X_{Lb} , мг/л; C_{Kp} – концентрація каротиноїдів, мг/л; D_{662} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 662 нм; D_{644} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 644 нм; D_{440} – оптична щільність суміші за довжини хвилі 440 нм.

Визначення кількості пігментів в розрахунку на 1 г сирової маси визначали за формулою [47]:

$$A = (C \times V) / (1000 \times m); \quad (2.7)$$

де, A – кількість пігментів, мг/г сирової маси; C – концентрація пігментів, мг/л; V – Об'єм витяжки пігментів, мл; m – наважка, г.

Визначення загального вмісту фенольних сполук. Сумарне визначення фенольних сполук проводили за допомогою методу Фоліна-Чокальтеу за модифікації Singleton and Rossi [288]. 50 мкл метального екстракту листків розводили в 450 мкл метанолу, а потім додавали 2,5 мл реагенту Фоліна-Чокальтеу та 2,0 мл 7% карбонату натрію. Після цього розчин інкубували за кімнатної температури протягом двох годин. Вимірювання виконували на спектрофотометрі при 765 нм.

Визначення антиоксидантної активності фенольних сполук. Антиоксидантну активність фенольних сполук визначали модифікованим методом Блуа [115]. Стабільний 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразилловий радикал (ДФПГ) використовували для визначення антиоксидантної активності рослинних екстрактів: 400 мкл розчину 0,2 мМ ДФПГ додавали до 50 мкл

екстракту рослин та 350 мкл метанолу. Через 30 хв поглинання вимірювали при 517 нм і перераховували у відсоток антиоксидантної активності (АА), використовуючи наступну формулу:

$$AA \% = 100 - \{ [(Ab_{Ssample} - Ab_{Sblank}) \times 100] / Ab_{Scontrol} \} \quad (2.7)$$

Визначення кількісного вмісту флавоноїдів. Кількісний вміст флавоноїдів у рослинному матеріалі визначали спектрофотометричним методом за $\lambda = 419$ нм. До 300 мкл екстракту послідовно додавали 200 мкл 0,1М розчину хлориду алюмінію ($AlCl_3$) і 300 мкл 1М ацетату натрію 73 (CH_3COONa). Калібрувальний графік будували за кверцетином (Sigma, Germany) [3].

Проведення ТШХ та ВЕТШХ. Якісний склад біохімічних сполук у листках суниці садової визначали методами тонкошарової хроматографії на пластинках Sorbfil (Silica gel 60) та високоефективної тонкошарової хроматографії на пластинках Merck (Silica gel 60) у системі розчинників хлороформ : оцтова кислота : метанол : вода (v/v – 60/32/12/8) з подальшою обробкою анісовим альдегідом і наступним нагріванням (5 хв за 105 °С). Індивідуальні сполуки у кількостях, необхідних для подальших досліджень, отримували за допомогою накопичувальної хроматографії.

ВЕРХ фенольних сполук. 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) при швидкості потоку 1 мл/хв. Фенольні сполуки були розділені в наступному градієнті А in В (% v/v): 0-5 хв., 15% А; 5-25 хв., 15-35% А; 25-35 хв., 35% А. УФ-спектри фенольних сполук вимірювали в діапазоні 200-450 нм. УФ-слід – при 254 нм. Елагову кислоту та рутин використовували як зовнішній стандарт для кількісного визначення фенольних сполук. Обробку і візуалізацію хроматографічних даних проводили за допомогою ПЗ AgilentChem Station and Corel Draw X3.

Газова хроматографія моносахаридів хітозану. Супернатант хітозану з сумішшю нейтральних моносахаридів у формі ацетатів поліолів розділяли на хромато-масспектрометрі Agilent 6890N/5973 (Німеччина), DB-225 mS 30м × 0,25 мм × 0,25 мкм, газ – гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випаровування – 250, інтерфейса – 280, термостата 220 (ізотермічний режим). Пробу вносили з діленням потоку 1:1000. Ідентифікацію моносахаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також за базою даних ChemStation.

Метод біотестування на гіберелову активність. Фізіологічну активність очищених речовин визначали методом біотесту на відрізках колеоптилів пшениці за Бояркіним. Для цього насіння озимої пшениці висівали на фільтрувальну бумагу з подальшим пророщуванням без доступу світла при 25 °С. Колептилі відділяли від коріння та зернівок та вирізали їх ділянки з однаковою довжиною (4 мм) за допомогою спеціальної конструкції. Для дослідження стимуляторів росту, відрізки поміщали в розчини з досліджуваними речовинами та витримували в темному місці при 25 °С. В якості контролю використовували 2% сахарозу. Вимірювання довжини колеоптилів проводили через 24 та 48 год. Дослідження проводили у 3-х кратній повторності [30].

2.6. Мікробіологічні методи досліджень

Мікобіоту модельних культур вивчали з використанням загальноприйнятих у мікології методів. Частини рослин та ґрунту розкладали на агаризоване середовище Чапека, у вологу камеру без попередньої обробки. Культивування проводили протягом 10–14 діб за температури $+25 \pm 2$ °С. Дослідження морфологічних структур виділених видів грибів здійснювали методом світлової мікроскопії (мікроскоп «XS-3320», MICROmed, Україна), для цього виготовляли тимчасові препарати. Для кожного варіанту обробки, використовували 4 повторності (4 рослини суниці садової на 1 повторність). Для ідентифікації мікроміцетів використовували визначники вітчизняних та іноземних авторів [54, 246]. Ізоляти збудників бактеріозів та мікозів

плодоовочевої продукції (PP-42, PP-43, PSP-31, PSP-33, PSP-35) були виділені з уражених зразків різних рослин та досліджені згідно з загальновизнаними у бактеріології та мікології методами [4, 6, 8, 27]. Також використано штами бактерій *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 8982 та *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) 7750 колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України. Виділені ізоляти мікроміцетів були ідентифіковані як збудники мікозів (родів *Fusarium* та *Alternaria*). Культури мікроорганізмів зберігались на картопляно-декстрозному агарі за температури 5 °С. Визначення антимікробної дії досліджуваних речовин проводили модифікованим експрес-методом лунок [7, 64].

Дослідження ефективності застосування біопрепаратів при адаптації суниці *in vivo* за умов штучного зараження інфікування ґрунтової суміші мікроміцетами роду *Rhizoctonia* проводили за прийнятими у фітопатології методиками [53].

2.7. Статистичні методи досліджень

Положення окремих видів мікроміцетів у структурі мікобіоти філоплани суниці визначали за критерієм частоти трапляння (ЧТ):

$$\text{ЧТ} = \frac{\text{кількість зразків, де вид виявлено} \cdot 100\%}{\text{загальна кількість зразків}}. \quad (2.8)$$

Рівень заселення (РЗ) мікроміцетами листя суниці вираховували за формулою :

$$\text{РЗ} = \frac{\mu \cdot 100\%}{n}, \quad (2.9)$$

де μ – число зразків листя, в яких виявлено даний рід (вид); n – загальна кількість досліджених проб листя.

Подібність мікобіоти філоплани визначали за значеннями коефіцієнта дискримінації Стугрена-Радулеску (ρ):

$$\rho = \frac{X + Y - Z}{X + Y + Z}, \quad (2.10)$$

де X – кількість видів грибів, які зустрічаються у філоплані контрольних рослин суниці; Y – кількість видів, які реєструються у філоплані оброблених хітозаном рослин, але відсутні у філоплані контролю; Z – кількість спільних видів, які зустрічаються філопланах обох варіантів рослин.

Даний коефіцієнт змінюється в межах від «-1» до «+1». Повна подібність видового складу мікроміцетів у філоплані контрольних і оброблених розчинами хітозану рослин спостерігається при $\rho = -1$, а при $\rho = +1$ – їх повна відмінність (дискримінація).

Для оцінки комплексів грибів у контрольному та обробленому розчином хітозану ґрунті використовували коефіцієнт спільності Жаккара:

$$Kj = \frac{c}{a + b - c} \cdot 100\% , \quad (2.11)$$

де a – кількість видів, що зустрічались у ґрунті рослин контролю; b – кількість видів, характерних для ґрунту рослин дослідного варіанту; c – кількість спільних видів [54].

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою ПЗ Image Pro Premier, Statistica 7., ExcelSTAT. Результати досліджень представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне результатів, одержаних із 3–4 повторень; m – стандартна похибка.

РОЗДІЛ 3.
ВПЛИВ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ І КОМПЛЕКСНИХ
БІОПРЕПАРАТІВ НА ФЕНОЛЬНИЙ СИНТЕЗ ТА СТІЙКІСТЬ
МОДЕЛЬНИХ КУЛЬТУР ПРОТИ ЗБУДНИКА
ЧОРНОЇ КОРЕНЕВОЇ ГНИЛІ

3.1. Специфіка морфогенезу і метаболоміки модельних культур в умовах *in vitro*

У природних умовах рослини постійно знаходяться під дією тих чи інших абіотичних та біотичних стрес-чиників, тому вивчення захисних механізмів та відповідних реакцій можуть носити неоднозначний характер. Доцільним є проведення досліджень на модельних культурах, отриманих за допомогою мікроклонального розмноження, які матимуть однаковий генотип, будуть вільні від патогенів та вирощуватимуться в сталих умовах, що дозволить знівелювати фонові зміни в самих рослинах. У наших дослідженнях як контрольні рослини використано тютюн звичайний *Nicotiana tabacum* L., який є класичною модельною культурою та суницю садову *Fragaria ananassa* Duch. Методики МКР для тютюна звичайного розроблено одними із перших серед усіх культур [11, 34, 242].

Суниця садова достатньо складний об'єкт для культури *in vitro*, що пояснюється конституційними ознаками, в тім числі здатністю первинних експлантів до активного синтезу фенольних сполук у відповідь на травматичний стрес. Якісний склад фенольного комплексу і кількість фенолів має виражену сортоспецифічність, що створює додаткові проблеми при введенні рослин в культуру *in vitro*. Пригнічення процесів синтезу і окиснення поліфенолів, зменшення рівня оксидативного стресу завдяки ретельному підбору компонентів живильного середовища є важливою складовою ефективності мікроклонального розмноження [38, 58]. Багаточисельні дослідження показали, що у суниці садової можна одержати як калюсну так і вегетативну культуру. Із всіх факторів, що визначають успіх мікроклонального розмноження найбільше

значення має генотип вихідної рослини, оскільки здатність до розмноження *in vitro* генетично обумовлена і великою мірою варіює у різних сортів [12].

Наші дослідження спрямовано на виявлення ролі гормональних факторів при мікроклонуванні рослин. Як вихідні рослини використовували асептичні мікророзетки. Для розробки методики власне мікроклонального розмноження суниці садової сорту Аліна вивчали вплив різних регуляторів росту на процеси росту експлантатів в культурі *in vitro*. Нами використано 6 варіантів модифікованого живильного середовища MS [242] з різними концентраціями та композиціями ауксинів, цитокинінів і гіберелінів (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Коефіцієнт розмноження мікророзеток суниці садової з використанням різної концентрації фітогормонів в умовах *in vitro*, мг/л

Аліна клон С3						Аліна клон С4					
0,5 БАП	1,0 БАП	1,5 БАП	0,5 БАП 0,75 ІМК	1,0 БАП 1,0 ІМК, 0,1 ГК	1,0 БАП 0,1 ІМК	0,5 БАП	1,0 БАП	1,5 БАП	0,5 БАП 0,75 ІМК	1,0 БАП 1,0 ІМК, 0,1 ГК	1,0 БАП 0,1 ІМК
3,4 ± 0,17	2,87± 0,14	2,87 ± 0,15	2,9 ± 0,25	4,9 ± 0,24	4,7 ± 0,28	5,5 ± 0,22	4,3 ± 0,25	4,9 ± 0,19	3,7 ± 0,39	7,7 ± 0,35	6,9 ± 0,30

Отримані нами результати засвідчують, що найбільш оптимальним середовищем для мікроклонального розмноження суниці садової клонів С3 та С4 виявився варіант №5, який містить 1,0 мг/л БАП, 1,0 мг/л ІМК, 0,1 мг/л гіберелової кислоти.

При цьому спостерігався значний ріст експлантатів, а коефіцієнт розмноження становив: С3 – 4,9; С4 – 7,7. (табл. 3.1, рис. 3.1). Встановлено, що зі збільшенням концентрації цитокинінів (В2: 1,0 мг/л БАП В3: 1,5 мг/л БАП) у експлантатів клону С3 значно знижувався коефіцієнт розмноження (2,8) порівняно з іншими варіантами середовищ. Слід зазначити, що розмноження рослин клону С3 відбувалося більш повільно порівняно із клоном С4. Для

експлантатів клону С4 мінімальний коефіцієнт розмноження спостерігався у варіанті № 4 (0,5 мг/л БАП та 0,75 мг/л ІМК) і досягав величини 3,7.



Рис. 3.1. Масове мікроклональне розмноження суниці садової сорту Аліна в культурі *in vitro*: А – клон С3, Б – клон С4

Для масового мікроклонального розмноження *N. tabacum* використано безгормональне живильне середовище MS та з додаванням 0,25 мг/л кінетину (рис. 3.2).

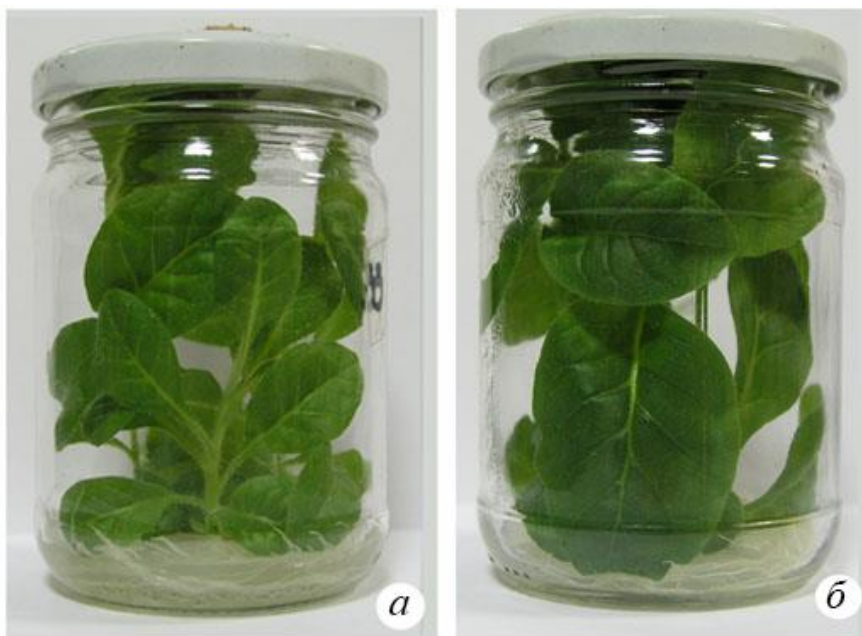


Рис. 3.2. Сформовані рослини-регенеранти *N. tabacum*: а) MS + 0,25 мг/л кінетину; б) б/г MS.

3.2. Вплив екзогенної саліцилової кислоти на морфогенез і антиоксидантний потенціал рослин-регенерантів в культурі *in vitro*

В ініціації адаптаційних реакцій рослин у відповідь на екзогенні стресові чинники безпосередньо задіяні специфічні органічні сполуки, які виконують функцію регуляторів фізіологічних процесів, а також беруть участь у молекулярному сигналінгу [20, 33]. Однією з таких речовин є саліцилова кислота (СК) — сигнальна молекула фенольної природи, яка в клітинах рослин міститься у вільній, глікозидній та метильованій формах, а також у глюкозоефірах і кон'югатах амінокислот [120]. У відповідь на дію патогенів СК стимулює генерування активних форм кисню, накопичення захисних PR-білків, активує ФАЛ (фенілаланінаміакліазу), реакцію надчутливості рослин, бере участь у функціонуванні НАДФН-оксидазної системи [60, 122, 150, 271]. За дії патогенів, еліситорів або екзогенного перексиду водню концентрація СК збільшується в десятки разів, після чого поступово знижується, що пояснюється її виходом із клітини в апопласт, перетворенням на леткий метилсаліцилат із подальшою дифузією в повітря, де він бере участь у дистанційному сигналінгу [66].

Нами досліджено 5 сортів суниці садової вітчизняної селекції: Аліна, Берегиня, Голосіївська рання, Дашенька київська та Факел. Отримані асептичні експлантати висаджували на живильне середовище MS, доповнене 0,5 мг/л БАП і 0,75 мг/л ІМК (контрольна група) та на аналогічне середовище з додаванням 25 мг/л саліцилової кислоти (експериментальна група). В результаті досліджень встановлено, що вміст саліцилової кислоти у живильному середовищі в концентрації 25 мг/л значно прискорює процеси пагоноутворення у експлантатах п'яти сортів суниці (рис. 3.3, табл 3.2.).

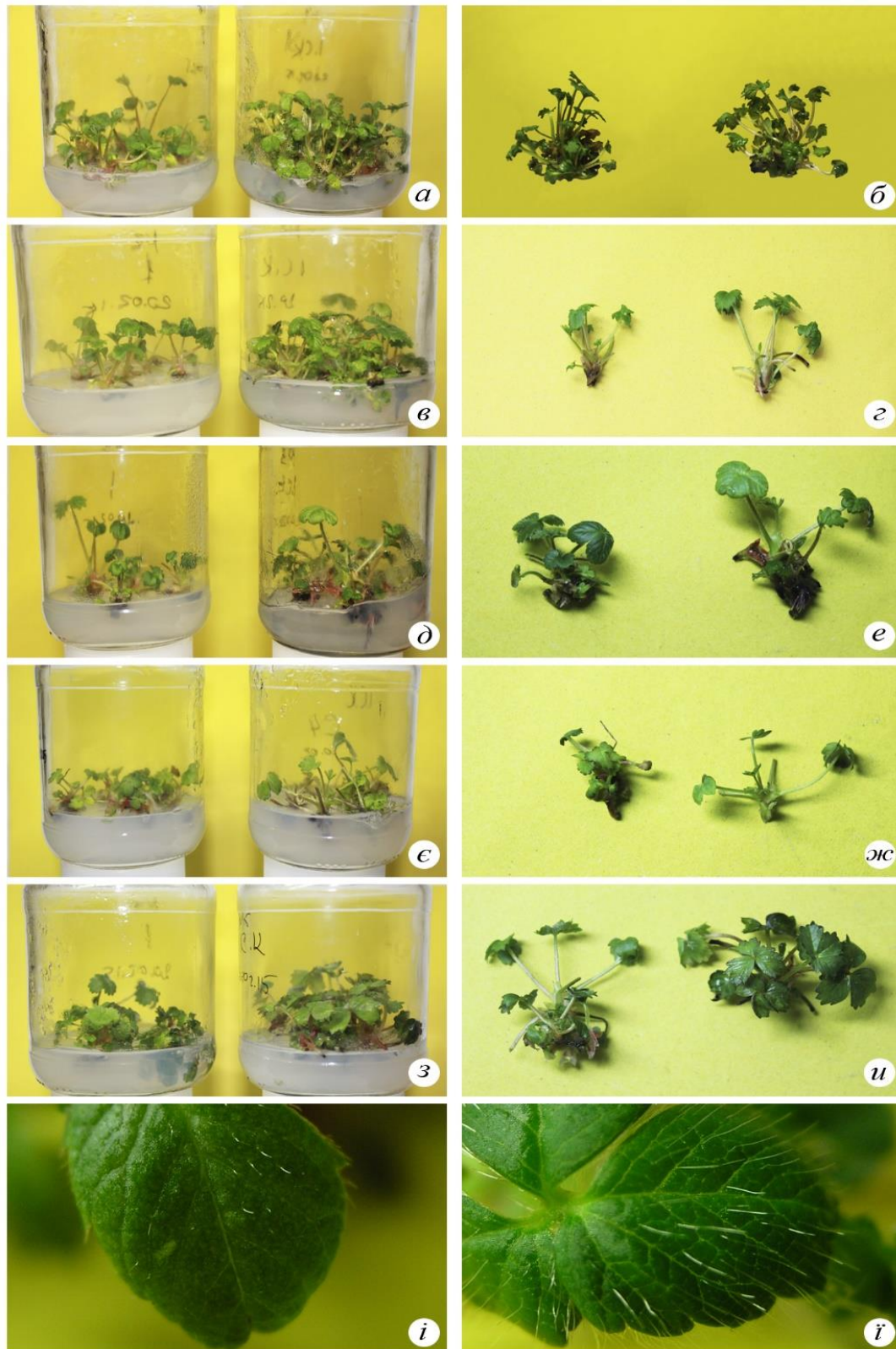


Рис. 3.3. Сортоспецифічність впливу саліцилової кислоти на органогенез суниці садової в культурі *in vitro*: а, б – сорт Берегиня; в, г – Факел; д, е – Голосіївська рання; є, ж – Аліна; з, и – Дашенька київська; мало опушена (К) (i) і густо опушена (СК) (i') адаксиальна поверхня листка сорту Голосіївська рання.

Втім слід зазначити, що біологічний ефект від дії СК на пагони суниці найкраще виявився у двох сортів, а саме Голосіївська рання (рис. 3.3, д, е; табл. 3.2) та Аліна (рис. 3.3, є, ж; табл. 3.2), для яких, порівняно з контролем, виявлено інтенсивну мультиплікацію пагонів у розетці та суттєве збільшення загальної площі листків (рис. 3.4). Водночас у сорту Берегиня СК викликала лише індукцію пагоноутворення з формуванням щільних розеток. Зокрема сорт Голосіївська рання характеризувався великою кількістю трихом на адаксиальних поверхнях листових пластинок (рис. 3.3, і). За додавання у живильне середовище саліцилової кислоти кількість трихом значно знижувалась або вони майже не утворювались.

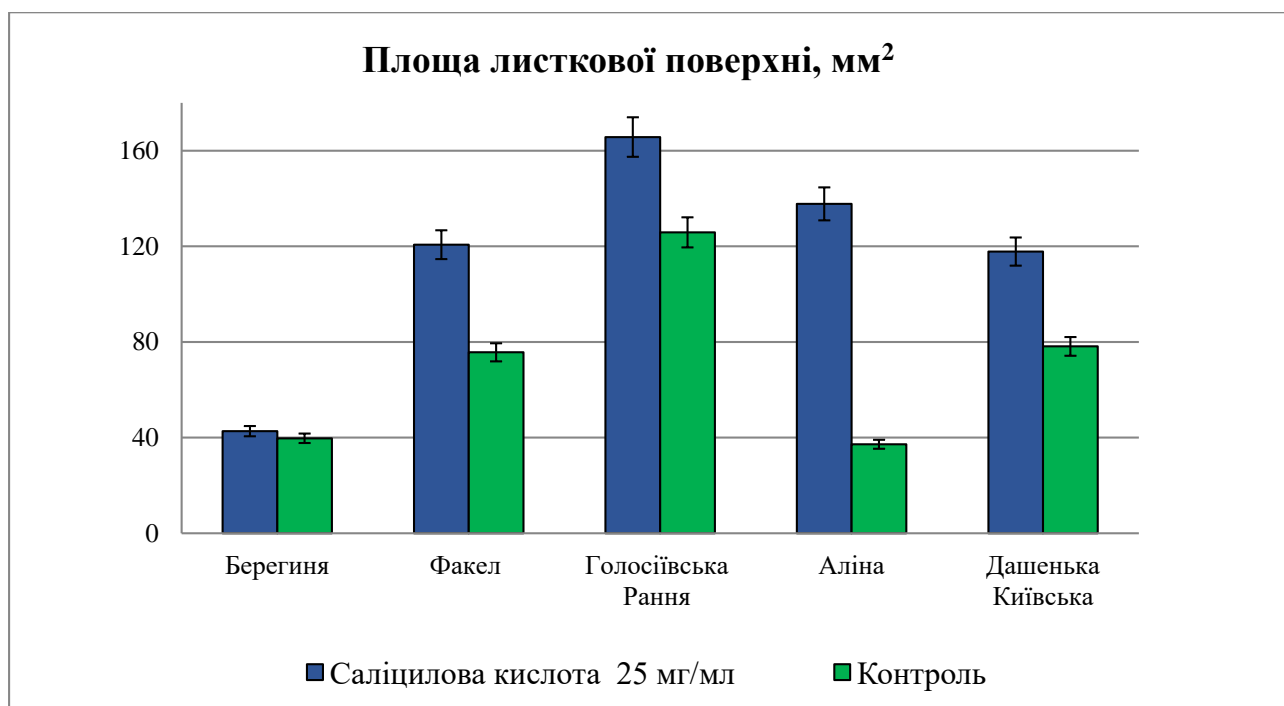


Рис. 3.4. Вплив саліцилової кислоти на площу листових пластинок суниці садової в культурі *in vitro* (21 доба культивування).

За показниками площі листової поверхні міжсортowa різниця відмічалась також у межах контрольної групи. Враховуючи, що за цим показником у відкритому ґрунті між даними сортами не виявлено суттєвої різниці. Вочевидь, що зазначені відмінності перш за все зумовлені режимом культивування і чутливістю рослин до умов *in vitro*.

Інтенсивність ростових процесів рослин-регенерантів у межах дослідженої групи сортів не залежала також і від загальної кількості фенольних сполук. Так, найбільшою площею листової поверхні в культурі *in vitro* характеризувалися рослини сорту Голосіївська рання, у листках якого визначено найвищий вміст фенольних сполук (табл. 3.2). При цьому суттєву різницю за площею листків виявлено між контрольною і досліджуваною групами рослин сорту Аліна, яка вірогідно зростала на фоні зменшення загального вмісту фенолів і, зокрема, флавоноїдів, завдяки індукції саліциловою кислотою. Необхідно відзначити, що обернена залежність ($r = -0.90$) між площею листової поверхні та вмістом флавоноїдів за умов використання СК визначено для всіх досліджених сортів.

Таблиця 3.2

Вплив саліцилової кислоти на вміст фенольних сполук у листках суниці садової *in vitro* (21 доба культивування; $M \pm m$; $n = 4$)

Сорт	Флавоноїди, мг/г		Феноли, мг/г		Флавоноїди/феноли	
	К*	СК**	К	СК	К	СК
Берегиня	$3,1 \pm 0,12$	$3,0 \pm 0,11$	$34,1 \pm 1,36$	$36,1 \pm 1,08$	0,09	0,08
Факел	$2,6 \pm 0,10$	$2,1 \pm 0,06$	$63,0 \pm 2,52$	$33,3 \pm 2,52$	0,04	0,06
Голосіївська рання	$3,4 \pm 0,14$	$1,6 \pm 0,06$	$74,5 \pm 3,73$	$55,9 \pm 3,73$	0,05	0,03
Аліна	$2,1 \pm 0,11$	$1,5 \pm 0,05$	$38,6 \pm 1,54$	$15,8 \pm 1,54$	0,05	0,09
Дашенька кийвська	$1,6 \pm 0,08$	$2,5 \pm 0,10$	$48,1 \pm 2,41$	$47,9 \pm 2,41$	0,03	0,05

К – контроль;

СК – саліцилова кислота 25 мг/л; жирним виділені значення, різниця між якими достовірна порівняно з контролем ($\alpha = 0,05$)

За відсутності екзогенної СК рівень взаємозв'язків між даними показниками у рослин-регенерантів помітно знижувався ($r = 0,36$). На відміну від рослин, які вирощувались на живильних середовищах з додаванням СК, достатньо тісний зв'язок виявлено між площею поверхні листків і вмістом у тканинах поліфенольних сполук ($r = 0,93$). На підставі цього можна припустити, що на формування листків впливає не загальна кількість фенолів, а їх якісний склад. Також очевидно, що СК є індуктором біохімічної перебудови рослин,

унаслідок якої синтезуються специфічні сполуки, у тім числі флавоноїди, які виконують функції регуляторів росту.

Аналіз якісного складу середньо- і малополярних сполук вторинного метаболізму методом ТШХ показав, що у контрольних зразках метанольних екстрактів листків після обробки пластинки анісовим альдегідом виявлено дев'ять сполук. На особливу увагу заслуговує речовина (K_2 , $R_f \sim 0,69$), яка утворює темнобуру пляму і виявляється лише у рослин, що вирощувались на живильних середовищах без додавання СК. У рослин, регенерація яких відбувалась під впливом екзогенної саліцилової кислоти, синтезувалися сполуки, що за положенням на хроматограмі і за реакцією на хромогеновий реактив виявляли близьку хімічну природу, але мали дещо вищу полярність ($СК_2$, $R_f \sim 0,64$). У рослин сорту Берегиня дана сполука (ймовірно, дитерпеноїд гіберелової природи) не синтезувалася, або її концентрація у листках була незначною і знаходилась за межами чутливості методу. За ростом пагонів і показниками площі листової поверхні у даного сорту в експерименті не визначено достовірної різниці. На відміну від інших сортів між швидкістю росту листків і наявністю виявленої індивідуальної сполуки ($СК_2$) існував прямий зв'язок. Дане припущення було перевірено на колеоптилях пшениці. Біологічну активність елюата, який отримували методом накопичувальної хроматографії, визначали за показниками розтягнення клітин колеоптилів. Встановлено, що додавання до розчину 2% сахарози виділеної і очищеної даної речовини стимулює розтягування клітин і призводить до збільшення довжини відрізків колеоптилів. Стимулююча дія $СК_2$ порівняно з дією гіберелової кислоти. За умови додавання до розчину сахарози одночасно $СК_2$ і ГБ (10 мкг/мл) спостерігалось гальмування ростових процесів. Аналогічний результат було отримано за умов сумісної дії на колеоптилі K_2 і ГБ (рис. 3.5).

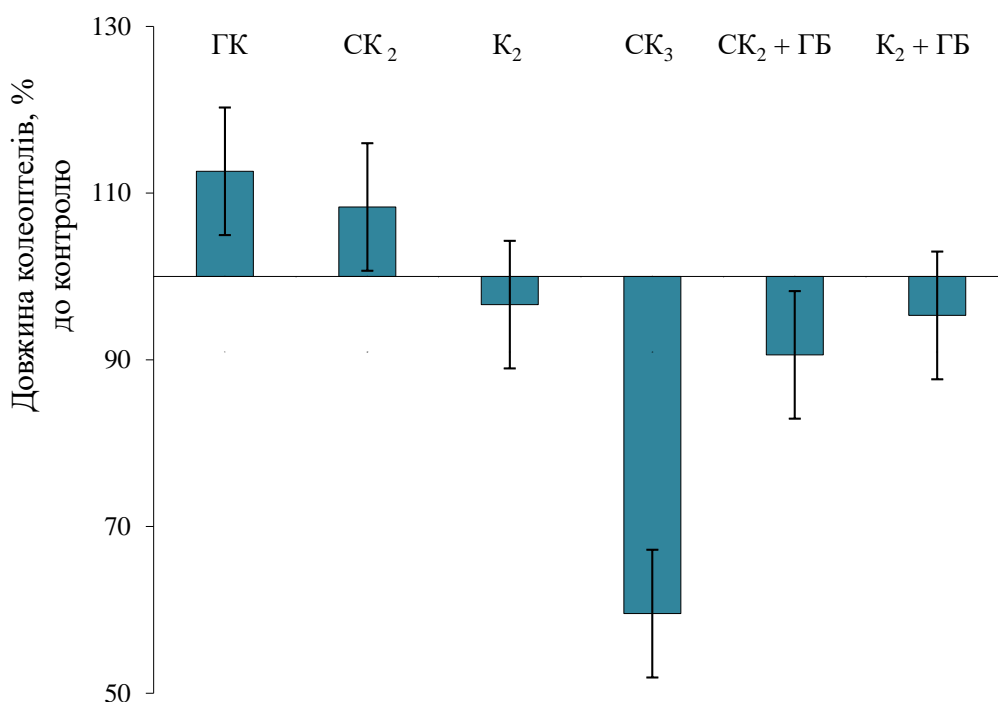


Рис. 3.5. Оцінка впливу біологічно активних сполук на процеси розтягування клітин колеоптилів пшениці: ГК – гіберелін; К₂ (Rf ~ 0,69); СК₂ (Rf ~ 0,64); СК₃ – речовина (Rf ~ 0,89).

Виражену гальмівну дію проявляла також неполярна сполука (СК₃, Rf ~ 0,89), яку було визначено у метанольних (100%) екстрактах досліджених сортів суниці. За додавання її до розчину 2% сахарози інтенсивність розтягування колеоптилів знижувалась майже на половину порівняно з контролем (рис.3.5). Це свідчить про те, що під впливом саліцилової кислоти відбувається значна перебудова вторинного метаболізму, яка супроводжується синтезом біологічно активних сполук з властивостями регуляторів росту.

Крім того, встановлено, що додавання СК до базових живильних середовищ стимулює синтез хлорогенової кислоти (5-кофеїлхінна кислота, 5-QCA), її ізомерів та інших кон'югатів оксикоричних кислоти (рис. 3.6). Всього методом ВЕТШХ виявлено 6 індивідуальних сполук з яскравою блакитною автофлуоресценцією, яка індукована УФ світлом (365 нм).

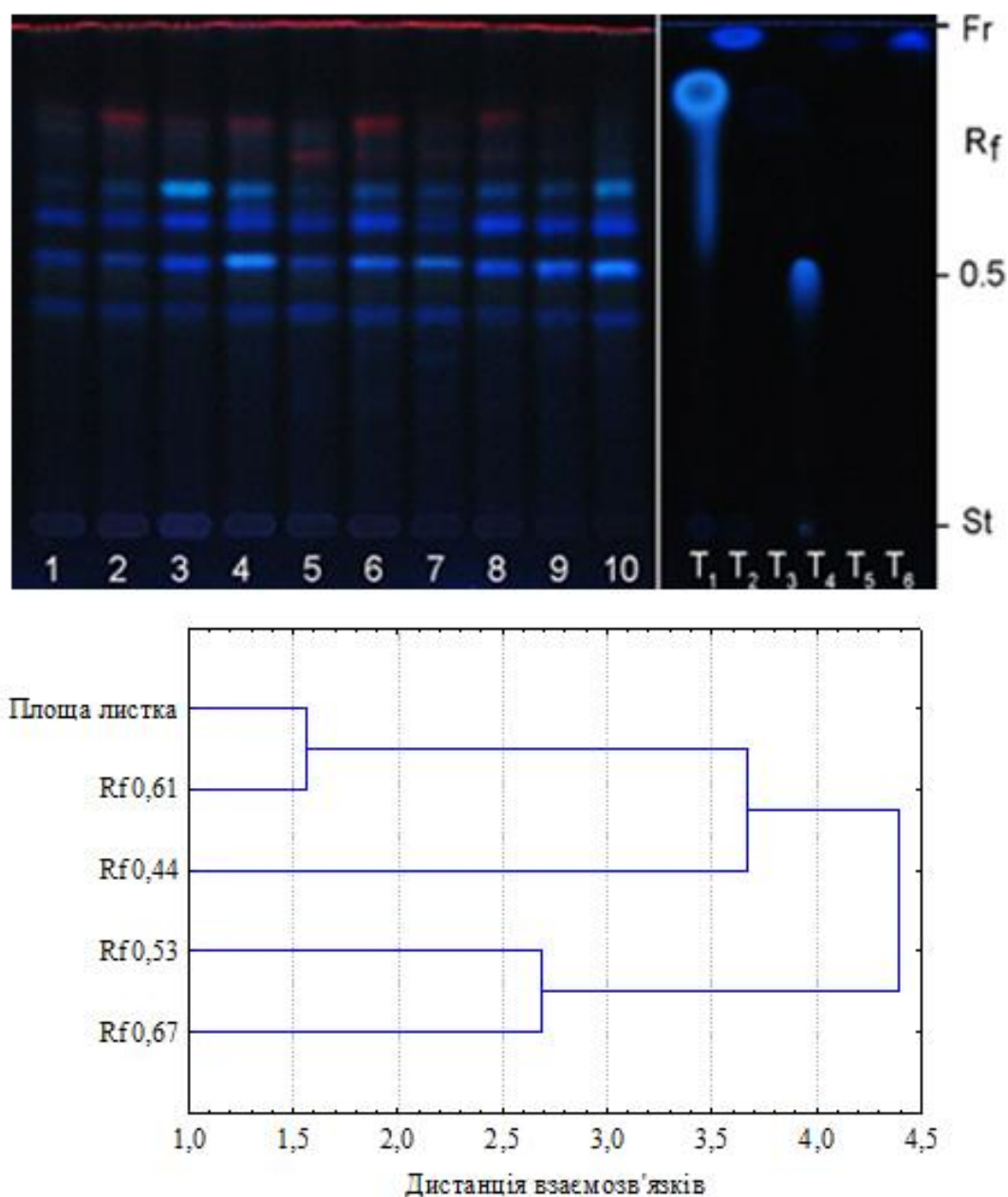


Рис. 3.6. Автофлуоресценція оксикоричних кислот рослин-регенерантів суниці садової на хроматограмі і результати кластерного аналізу можливих зв'язків між рівнем їх накопичення і площею листків: 1, 2 – сорт Берегиня, 3, 4 – Факел, 5, 6 – Голосіївська рання, 7, 8 – Аліна, 9, 10 – Дашенька київська, які вирощені на ЖС без і з СК відповідно; стандарти фенолкарбонових кислот: Т₁ – кавова; Т₂ – ферулова; Т₃–Т₄ – хлорогенова (5-QCA); Т₅ – р-кумарова; Т₆ – ванілінова.

За допомогою фотоденситометричного аналізу хроматограми було з'ясовано, що за співвідношенням концентрації фенольних сполук найтісніший зв'язок існує (коефіцієнт кореляції, $r = 0,88$) між вмістом речовини, яка за ідентичним положенням на хроматограмі специфічного стандарту, характеру флуоресценції і реакцією на хромагенні реактиви може бути визначена, як хлорогенова кислота (5-QCA, $R_f \sim 0,53$) та іншим кон'югатом оксикоричної кислоти ($R_f \sim 0,61$) (рис. 3.7).

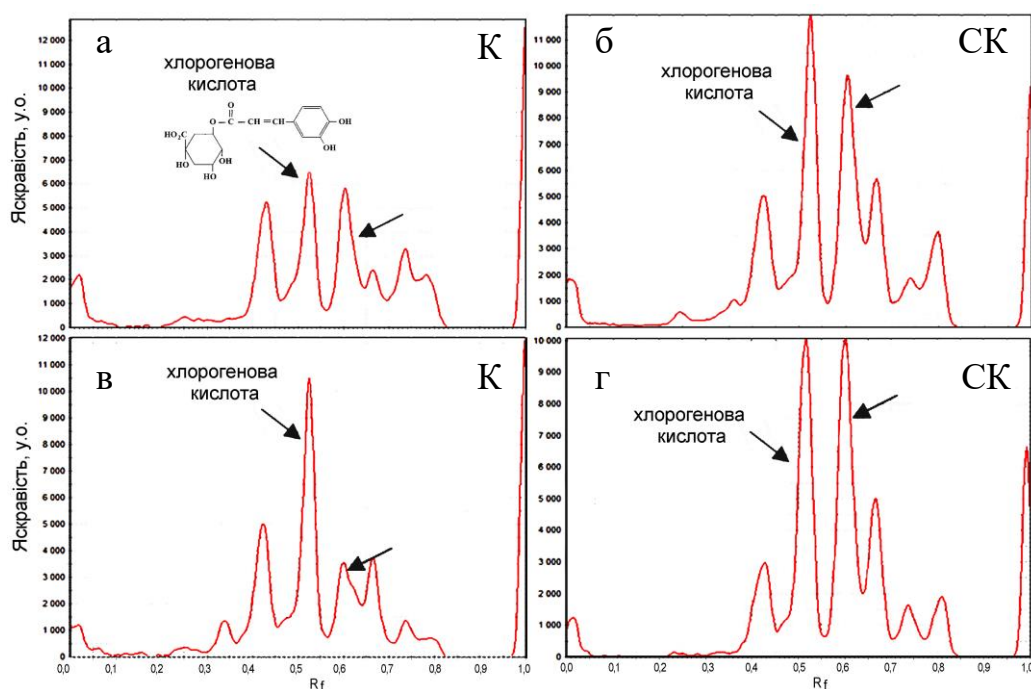


Рис. 3.7. Фотоденситограма хроматограми рослин-регенерантів суніці садової: а, б – сорт Голосіївська рання, в, г – сорт Аліна (к – контроль; ск – саліцилова кислота)

Між рівнем накопичення останньої сполуки та площею листкової поверхні також виявлено достовірний кореляційний зв'язок з ($r = 0,78$). Індуковане підвищення її концентрації в тканинах листків різнилося за сортовими відмінностями і колиалося в межах 1,1-3,7 рази. За рівнем індукованого підвищення концентрації даної сполуки у порядку зростання сприйнятливості рослин, досліджені сорти розташовуються в наступний ряд: Березиня (у 1,07 рази) < Факел (1,57) < Дашенька київська (1,21) < Голосіївська рання (1,64) < Аліна (2,28 рази).

Збільшення концентрації 5-QCA та інших похідних коричних і оксикоричних кислот, похідних флорогюцину і фенілетанолу у тканинах листків суниці садової під впливом екзогенної СК є наслідком індукованої перебудови фенілпропаноїдного синтезу, що суттєво впливає на фізіологічний стан рослин, прискорює процеси органогенезу у регенерантів в умовах *in vitro*, що є критичним показником ефективності мікроклонального розмноження рослин. На фоні зменшення загальної кількості фенолів у листках (у тім числі флавоноїдів), підвищення концентрації кон'югатів оксикоричних кислот створює передумови для пробудження апікальних і пазушних бруньок, а також стимулює закладання адвентивних бруньок, внаслідок чого збільшується загальна кількість пагонів у розетках.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що додавання саліцилової кислоти в ЖС у концентрації 25 мг/л значно прискорює процеси пагоноутворення. Порівняно з контролем у сортах Голосіївська рання і Аліна виявляється інтенсивна мультиплікація пагонів у розетці і вірогідно збільшується загальна площа листків. За умови використання екзогенної СК визначено обернену залежність ($r = -0,90$) між площею листків і вмістом флавоноїдів. Без додавання СК рівень взаємозв'язків між даними показниками у рослин-регенерантів є порівняно низьким ($r = 0,36$). Під впливом СК відбувається перебудова вторинного метаболізму, яка супроводжується синтезом біологічно активних сполук, у тім числі терпеноїдів і кон'югатів оксикоричних кислот з властивостями регуляторів росту.

3.3. Ризогенез та адаптація рослин-регенерантів модельних культур до умов *ex vitro*

Згідно Р. Г. Бутенко індукцію ризогенезу можна викликати декількома шляхами: культивування пагонів або рослин-регенерантів на середовищі з невеликою кількістю ауксинів, розведення в 2 рази мінерального складу безгормонального живильного середовища MS, обгортання нижньої частини пробірок фольгою або додавання в живильне середовище активованого вугілля,

враховуючи пригнічувальну дію на процес коренеутворення високої інтенсивності світла [12].

Для індукції ризогенезу використано пагони з двома-трьома трійчастими листками, які культивувалися на різних варіантах живильних середовищ (табл. 3.3). З представлених даних є очевидним, що за використання живильного середовища, доповненого активованим вугіллям, найбільший відсоток утворення коренів рослинами-регенерантами становив для клону С3 90%, для клону С4 - 98%, з довжиною коренів $76 \pm 0,5$ мм та $94 \pm 0,5$ мм відповідно.

Таблиця 3.3

Вплив компонентів живильного середовища на індукцію ризогенезу рослин-регенерантів суниці садової

Живильне середовище	Аліна клон С3		Аліна клон С4	
	Утворення коренів від висаджених, %	Середня довжина коренів, мм	Утворення коренів від висаджених, %	Середня довжина коренів, мм
MS	30	$28 \pm 0,2$	42	$34 \pm 0,2$
$\frac{1}{2}$ MS + активоване вугілля	90	$76 \pm 0,5$	98	$94 \pm 0,5$
$\frac{1}{2}$ MS + 0,5 ІМК	70	$45 \pm 0,2$	85	$52 \pm 0,2$

Примітка. Різниця достовірною при $p \leq 0,05$

Дещо інші результати отримано за використання середовища $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 ІМК, при цьому відсоток ризогенезу для клону С3 становив 70%, для клону С4 – 85%. Найнижчі показники коренеутворення спостерігалися на безгормональному середовищі MS: клон С3 – 30%, клон С4 – 42%. За культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS з додаванням активованого вугілля протягом 3-4 тижнів формувалися корені та наростала вегетативна маса (рис. 3.8). Отримані рослини-регенеранти були придатні для подальшої адаптації.

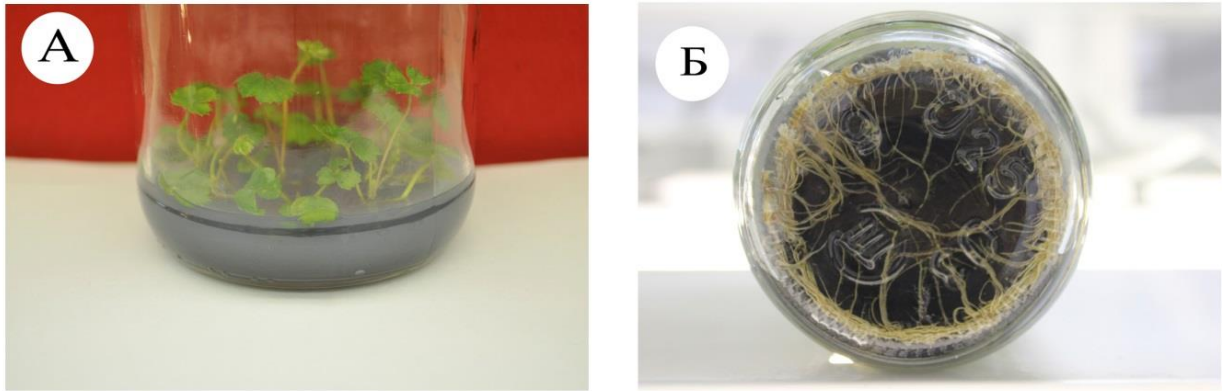


Рис. 3.8. Коренеутворення рослин регенерантів сорту Аліна на середовищі $\frac{1}{2}$ MS + активоване вугілля: А – Клон С3, Б – Клон С4

Індукцію ризогенезу *N. tabacum* проводили на середовищі MS з додаванням 1 мг/л ІМК. Формування та ріст коренів було зафіксовано на 10–13 добу культивування (рис. 3.9).



Рис. 3.9. Формування коренів *N. tabacum* на 12 добу культивування *in vitro*

Важливим етапом у мікроклональному розмноженні є процес адаптації рослин-регенерантів та висадження їх у субстрат. Нами як субстрат використано торф та суміш торф : перліт : пісок у співвідношенні 3:1:1 (табл. 3.4.).

Таблиця 3.4

Приживлюваність рослин-регенерантів суниці садової в субстратах

Субстрат	Кількість висаджених рослин, шт.	Приживлюваність рослин	
		шт.	%
Торф	30	27	90
Торф : Перліт : Пісок 3 : 1 : 1	30	28	93
НІР _{0,05}	-	1,3	4,2

Для отримання якісного однорідного матеріалу рослин-регенеранти відсортовували, проводили вкорочення коренів до 30-40 мм для того, щоб запобігти заломленню коренів та подальшому їх загниванню. Висаджені на субстрат рослини утримували у вологій камері протягом 10-14 днів за температури 25 °С з поступовим зниженням вологості ступінчастим методом.



Рис. 3.10. Процес адаптації суниці садової: а – 5-та доба адаптації; б – 25-та доба адаптації.

Через 4-5 тижнів у рослин формувались 3-4 листки та мичкувата коренева система. Ефективність адаптації на обох субстратах становила понад 90% (рис. 3.10).

Адаптацію рослин *N. tabacum* проводили прямим методом, не виймаючи рослини-регенеранти з культурального посуду та при відкритих кришках і з додаванням водопровідної води до живильного середовища для запобігання висихання рослин. Витримували регенеранти під марлевым накриттям у нестерильній воді протягом 5-7 діб. Після чого рослини відмивали від живильного середовища висаджували у субстрат (ґрунт : пісок – 3 : 1). За умови використання такої методики адаптації рослин-регенерантів одержали надзвичайно високу їх приживлюваність (понад 85 %). Отримані адаптовані рослини використовували у подальших експериментах (рис. 3.11).



Рис. 3.11. Адаптована рослина *N. tabacum* до умов *ex vitro*

3.4. Дослідження ефективності застосування біопрепаратів при адаптації *Fragaria ananassa* Duch. до умов *ex vitro*

При застосуванні біопрепаратів спостерігалось формування нових пагонів та листків, прискорювалися процеси розвинення кореневої системи (рис. 3.12) та істотно підвищувався вихід життєздатних рослин.



Рис. 3.12. Ріст та розвиток рослин суниці садової *in vivo* за умов застосування біопрепаратів (А: ліворуч – Триходермін; праворуч – контроль, Б: ліворуч – контроль; праворуч – Фітоцид)

Порівняно до контролю та еталону найкращим виявився варіант із застосуванням суспензії, що містила конідії та міцелій *Trichoderma lignorum* (приживлення рослин-регенерантів становила в середньому 92,4-97,3%) (табл. 3.5).

При цьому спостерігався значний рістстимулюючий ефект: висота пагонів рослин збільшувалась на 40-55%, а загальна довжина коренів на 40-48 %. Застосування біопрепаратів Фітоцид, ФітоХелп та Планриз також сприяло збільшенню приживлення рослин на етапі їх адаптації на 18-26%, 13-16% та 17 – 21% відповідно.

Таблиця 3.5

Вплив біопрепаратів на морфометричні показники рослин-регенерантів
суниці садової в період адаптації до умов *ex vitro*

Клони сорту суниці садової Аліна	Кількість адаптованих рослин до умов <i>ex vitro</i> , %	Середня висота пагонів, мм	Середня довжина коренів, мм	Кількість утворених пагонів, шт.
Контроль				
С-4	68,2	26,8	22,4	2,7
С-5	74,1	33,1	28,7	3,4
С-6	70,3	32,4	30,5	2,9
Фітоцид				
С-4	92,1	57,3	46,7	5,4
С-5	90,5	54,0	51,1	5,9
С-6	87,8	61,8	47,2	6,1
Планриз				
С-4	86,4	44,6	41,3	4,8
С-5	89,6	49,3	44,7	4,7
С-6	87,3	52,7	51,0	5,3
ФітоХелп				
С-4	78,6	42,1	35,4	3,3
С-5	85,1	39,4	39,7	3,8
С-6	83,9	47,9	41,0	4,1
Триходермін				
С-4	94,8	60,1	43,3	6,8
С-5	97,3	65,3	48,6	7,6
С-6	92,4	54,2	54,2	6,2
<i>HIP₀₅</i>	<i>1,12</i>	<i>2,03</i>	<i>1,67</i>	<i>0,56</i>

Суниця садова є однією з найчутливіших культур до ураження ґрунтовими мікроміцетами родів *Fusarium*, *Verticillium*, *Cylindrocarpon*, *Pythium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*. Фітопатогенні гриби роду *Rhizoctonia* є основними і найагресивнішими патогенами для вкорінення ягідних культур. Зараження рослин у період укорінення збудниками корневих гнилей призводить до погіршення якості садивного матеріалу, негативно впливає на їх приживлюваність при адаптації у відкритому ґрунті. За результатами дослідження ефективності біопрепаратів при штучному зараженні ґрунтової суміші мікроміцетами роду *Rhizoctonia* показано, що при застосуванні Триходерміну, Фітоциду, ФітоХелпу та Планриз у значно підвищувалася

стійкість рослин до ураження. Зокрема, найбільший вихід адаптованих рослин спостерігався у варіанті із Триходерміном (рис. 3.13).



Рис. 3.13. Ріст та розвиток рослин суниці садової за умов зараження ґрунтової суміші мікроміцетами роду *Rhizoctonia* (А – на початку зараження, Б – через 4 тижні, ліворуч – варіант із застосуванням Триходерміну, праворуч – контроль)

Дослідження з визначення ефективності біопрепаратів показали, що при застосуванні Триходерміну, Фітоциду, ФітоХелпу та Планризу підвищувалась стійкість рослин до ураження. Так, кількість здорових рослин у контролі становила 65,3%, у варіантах з біопрепаратами – 72,4 – 82,3%, відповідно ступінь ураження – 21,3% проти 6,8-12,4% (табл.3.6).

Таблиця 3.6

Біологічна ефективність біопрепаратів щодо збудника чорної кореневої гнилі суниці садової (сорт суниці садової Аліна) через 4 тижні

Препарати	Норма внесення препарату, мл/л	Кількість здорових рослин, %	Ступінь ураження кореневої системи, %	Біологічна ефективність, %
Контроль	-	65,3	21,3	-
Фітоцид	1	78,6	7,5	67,2
Планриз	35	75,4	10,2	62,3
ФітоХелп	1,5	72,4	12,4	57,7
Триходермін	8	82,3	6,8	72,9
<i>НІР₀₅</i>		2,31	1,14	

За використання біопрепаратів на підземній частині рослини спостерігалось утворення бурих плям, а у контролі – невеликих виразок і побуріння тканин. Найвищою виявилась біологічна ефективність проти *Rhizoctonia* spp. виявлено у біопрепараті Триходермін – 72,9%. Загалом інші біопрепарати характеризувалися задовільним рівнем біологічної ефективності. Так для Фітоциду, Планриз та Фітохелпу даний показник становив 67,2 %, 57,7 %, 62,3% відповідно.

Отже, застосування біопрепаратів Триходерміну, Фітоциду, ФітоХелпу та Планриз при адаптації рослин суниці садової до умов *ex vitro* сприяє підвищенню кількості адаптованих рослин в середньому на 17-28 %, активізації розвитку нових пагонів та листків, прискоренню процесів формування кореневої системи, підвищенню стійкості рослин до ґрунтових фітопатогенів роду *Rhizoctonia* spp.

Висновки до 3 розділу:

1. Підібрано і оптимізовано методику МКР суниці садової сорту Аліна клонів С3 та С4. Визначено стерилізуючий агент високої ефективності - 0,1 % розчин HgCl_2 . Встановлено, що найоптимальнішим живильним середовищем для масового МКР суниці садової сорту Аліна є MS з додаванням 1,0 мг/л БАП, 1,0

мг/л ІМК і 0,1 мг/л ГК, що дозволяє стабільно отримувати коефіцієнт розмноження рослин на рівні 4,9 для клону С3 і 7,7 для С4.

2. З'ясовано, що саліцилова кислота у концентрації 25 мг/л значно прискорює процеси пагоноутворення експлантатів суниці садової в культурі *in vitro*. Порівняно з контролем у сортів Голосіївська рання і Аліна виявляється інтенсивна мультиплікація пагонів у розетці і достовірно збільшується загальна площа листків.

3. 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/л) у рослин-регенерантів *in vitro* посилюється обернена залежність ($r=-0,90$) між площею листків і вмістом флавоноїдів.

4. Підібрано середовище для ризогенезу та адаптації суниці садової. Найбільший відсоток ризогенезу становив 90% - клон С3 та 94% - клон С4 на середовищі $\frac{1}{2}$ MS + активоване вугілля. Адаптація до умов *in vivo* проводилась на торф'яному субстраті та субстраті з використанням торфу: перліту:піску у співвідношенні 3:1:1. Ефективність адаптації при цьому становила понад 90%.

5. Установлено, що застосування біопрепаратів Триходерміну (8 мл/л), Фітоциду (1 мл/л), ФітоХелпу (1,5 мл/л) та Планриз (35 мл/л) при адаптації рослин суниці садової до умов *ex vitro* сприяло підвищенню кількості адаптованих рослин у середньому на 17-28 %, активізації розвитку нових пагонів та листків, прискоренню процесів утворення кореневої системи, підвищенню стійкості рослин до ґрунтових фітопатогенів роду *Rhizoctonia* spp.

Матеріали розділу опубліковано у працях [18, 76, 77, 78, 79, 80]

РОЗДІЛ 4.

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ PR-БІЛКІВ РОСЛИН ЗА ДІЇ ХІТОЗАНІВ ГРИБНОГО І ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

4.1. Визначення фізико-хімічних характеристик хітозанів грибною і тваринного походження

Для дослідження індукованої хітозанами експресії генів PR-білків визначено фізико-хімічні характеристики хітозанів тваринного і грибною походження. Ключовими параметрами біологічної активності хітозанів є молекулярна маса і ступінь деацетилювання.

Ступінь деацетилювання хітозану визначали кислотно-лужним титруванням. Висушений хітозан ($m = 0,2$ г) розчиняли у 20 см^3 $0,1\text{М}$ HCl та 25 см^3 дистильованої води. Після 30 хв. послідовного перемішування на магнітній мішалці, додавали наступну порцію дистильованої води (25 см^3) та продовжували перемішування протягом наступних 30хв. За умови повного розчинення хітозану, розчин титрували $0,1\text{ М}$ гідроксидом натрію (NaOH) з використанням автоматичної бюретки (точність $0,01\text{ см}^3$) та високочутливим рН-метром, яким замірювали зміни рівня рН після виходу кожних $0,5\text{ см}^3$ титрувального розчину (табл. 4.1).

За результатами титрування (рис. 4.1) з'ясовано, що точки перегину на графіку для хітозану отриманого з комах *Hermetia illucens* становить: $v_1=6,5$, $v_2=17,5$ тоді як для хітозану отриманого з грибів *Agaricus bisporus*: $v_1=7$, $v_2=16,5$.

Таблиця 4.1.

Зміна рівню рН при титруванні розчинів хітозану для визначення ступеню
деацетилювання

Кількість 0,1 М NaOH, мл	рН розчину хітозану отриманого з <i>Hermetia illucens</i>	рН розчину хітозану отриманого з <i>Agaricus bisporus</i>	Кількість 0,1 М NaOH, мл	рН розчину хітозану отриманого з <i>Hermetia illucens</i>	рН розчину хітозану отриманого з <i>Agaricus bisporus</i>
0	1,96	1,58	13	5,21	5,12
0,5	2,01	1,61	13,5	5,33	5,36
1	2,04	1,65	14	5,42	5,49
1,5	2,09	1,71	14,5	5,58	5,63
2	2,13	1,77	15	5,69	5,75
2,5	2,17	1,86	15,5	5,8	5,92
3	2,26	1,93	16	5,97	6,06
3,5	2,33	2,04	16,5	6,17	6,31
4	2,43	2,16	17	6,35	7,41
4,5	2,54	2,28	17,5	6,57	8,92
5	2,67	2,42	18	7,58	9,83
5,5	2,86	2,54	18,5	10,01	10,87
6	3,11	2,67	19	10,52	11,23
6,5	3,45	2,82	19,5	10,88	11,43
7	3,78	2,98	20	11,1	11,49
7,5	3,98	3,49	20,5	11,23	11,55
8	4,15	3,75	21	11,28	11,61
8,5	4,22	3,91	21,5	11,35	11,66
9	4,37	4,07	22	11,41	11,7
9,5	4,48	4,23	22,5	11,46	11,75
10	4,67	4,35	23	11,51	11,79
10,5	4,73	4,49	23,5	11,57	11,85
11	4,86	4,63	24	11,63	11,89
11,5	4,95	4,76	24,5	11,7	11,9
12	5,07	4,89	25	11,75	11,95
12,5	5,17	5,02	-	-	-

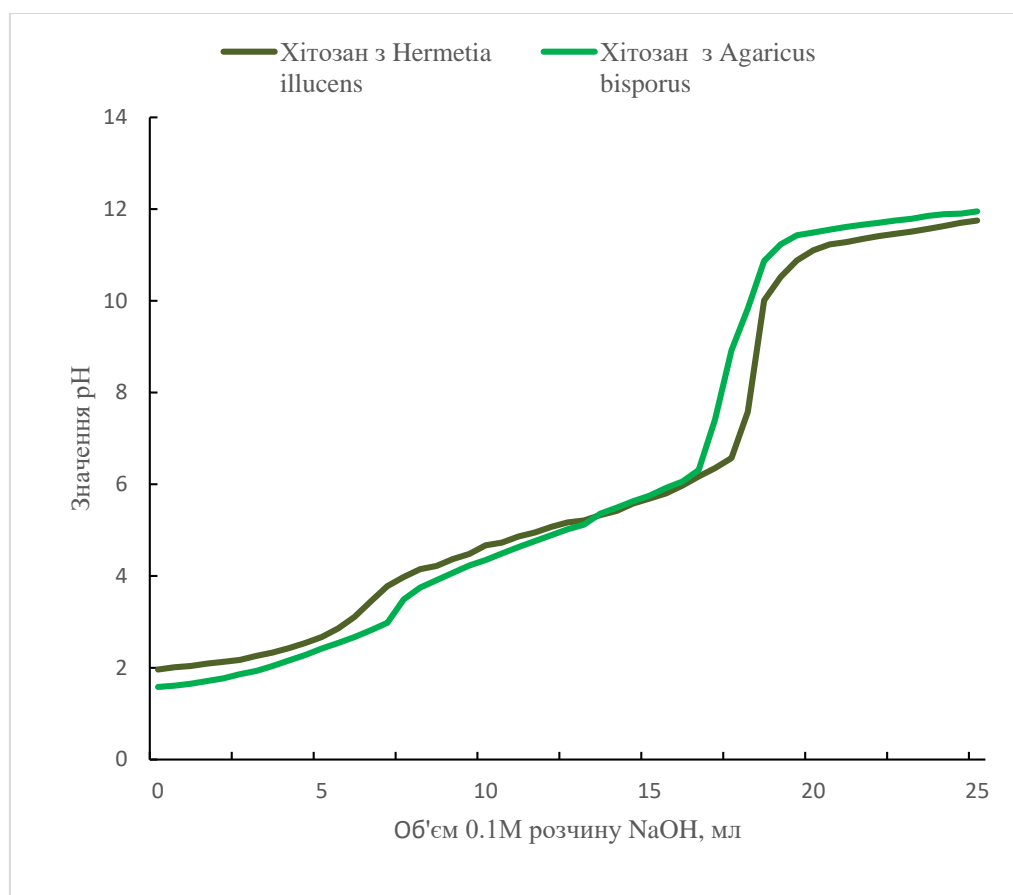


Рис. 4.1. Криві титрування розчинів хітозану для визначення ступеню деацетилювання

Встановлено, що ступінь деацетилювання хітозану, отриманого з личинок *Hermetia illucens* становив 90,69%, з плодових тіл *Agaricus bisporus* – 80,39%. Можна дійти висновку, що грибний хітозан за однакових умов депротейонізації і вилуговування мав менший показник ступеня деацетилювання.

Для визначення молекулярної маси хітозану необхідним є встановлення кінематичної в'язкості його розчину з наперед відомою концентрацією. Нами використано розчини хітозану отриманого з *Hermetia illucens* (ChII) та неосвітлені і освітлені форми хітозану отриманих з грибів *Agaricus bisporus* (ChI). Результати проведених досліджень наведено у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Вимірювання кінематичної в'язкості різних розчинів хітозану

№	Рідина	Час витікання рідини в секундах			Σ
		1	2	3	
1	CH ₃ COOH (Контроль)	33,78	33,85	33,64	33,76
2	1% ChII	95,32	94,15	94,75	94,74
3	1% освітлений ChI	33,51	33,49	33,77	33,59
4	1% неосвітлений ChI	34,13	33,59	33,84	33,85
5	2% неосвітлений ChI	34,25	34,55	34,17	34,32
6	3% неосвітлений ChI	36,20	35,94	36,44	36,19

Використовуючи отримані показники, за допомогою конвертеру величин UnitConverter, можна вичислити середню молекулярну масу досліджуваної речовини. Для високомолекулярного хітозану, отримане значення становило 3003 сП. Це засвідчує, що дана речовина є високомолекулярною сполукою (табл. 4.3). Для низькомолекулярного хітозану, виділеного з грибів *Agaricus bisporus* середня молекулярна маса становила 106-115 сП, що свідчить про те, що дана сполука є низькомолекулярним хітозаном.

Таблиця 4.3

Показники в'язкості для різних розчинів хітозану

№ п/п	Значення кінематичної в'язкості
CH ₃ COOH (Контроль)	1,070187
1% ChII	3,003163
1% освітлений ChI	1,064769
1% неосвітлений ChI	1,059381
2% неосвітлений ChI	1,073011
3% неосвітлений ChI	1,091079

Загальновідомо, що до складу грибного хітину і хітозану входять глюкани, які зв'язуються з глюкозамінним ланцюгом іонними і водневими зв'язками. Для з'ясування моносхаридного складу виділеного нами хітозану використовували метод газової хроматографії. Оскільки глюкани і розгалужені полісахариди, у складі яких є глюкоза, маноза, фукоза та ін., є нерозчинним стабільним комплексом, ідентифікацію моносхаридів проводили після гідролізу грибного хітозану у 2 н розчині HCl протягом 5 год за 100 °C. Обробку зразків виконували за Albershein et al. [100]. Після гідролізу зразок просушували під вакуумом та тричі промивали дистильованою водою. До зразка додавали боргідрит натрію та залишали на 10 год за кімнатної температури (в захищеному від світла місці). Далі розчин нейтралізовували за допомогою іонообмінної смоли КУ-2 в H⁺ формі, фільтрували, просушували і тричі промивали метанолом, який випаровували. До отриманої проби додавали 0,5 мл очищеного піридину і 0,5 мл оцтового ангідриду. Суміш гідролізовували протягом 15 хв за 100 °C. Просушували і додавали 2-3 мл хлороформу. Отриману суспензію центрифугували 20 хв в скляних пробірках за 2500 g. Супернатант з сумішшю нейтральних моносхаридів у формі ацетатів поліолів розділяли на хромато-маспектрометрі Agilent 6890N/5973, DB-225 mS 30м × 0,25 мм × 0,25 мкм, газ – гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випаровування становила 250°C, інтерфейса – 280°C, термостата – 220°C (ізотермічний режим). Зразок вносили з діленням потоку 1:1000. Ідентифікацію моносхаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також за базою даних ChemStation. У результаті проведеного нами аналізу було підтверджено, що до складу грибного хітозану входять моноцукри (рис. 4.2).

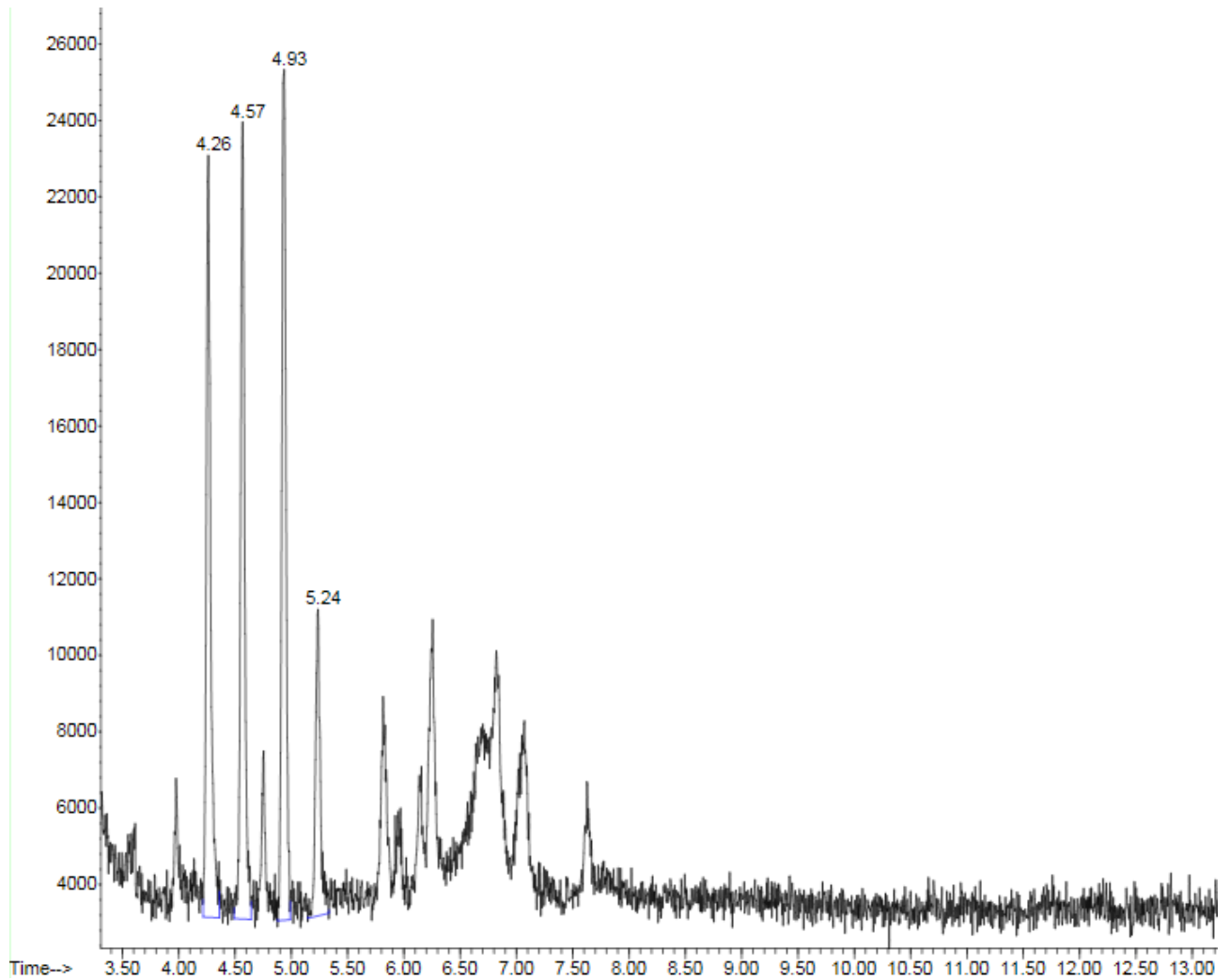


Рис. 4.2. Результат газової хроматографії ацетатів поліолів, що отримані гідролізом грибного хітозану.

Ідентифікація моноцукрів з стандартами дозволили ідентифікувати рамному і фукозу (рис. 4.3).

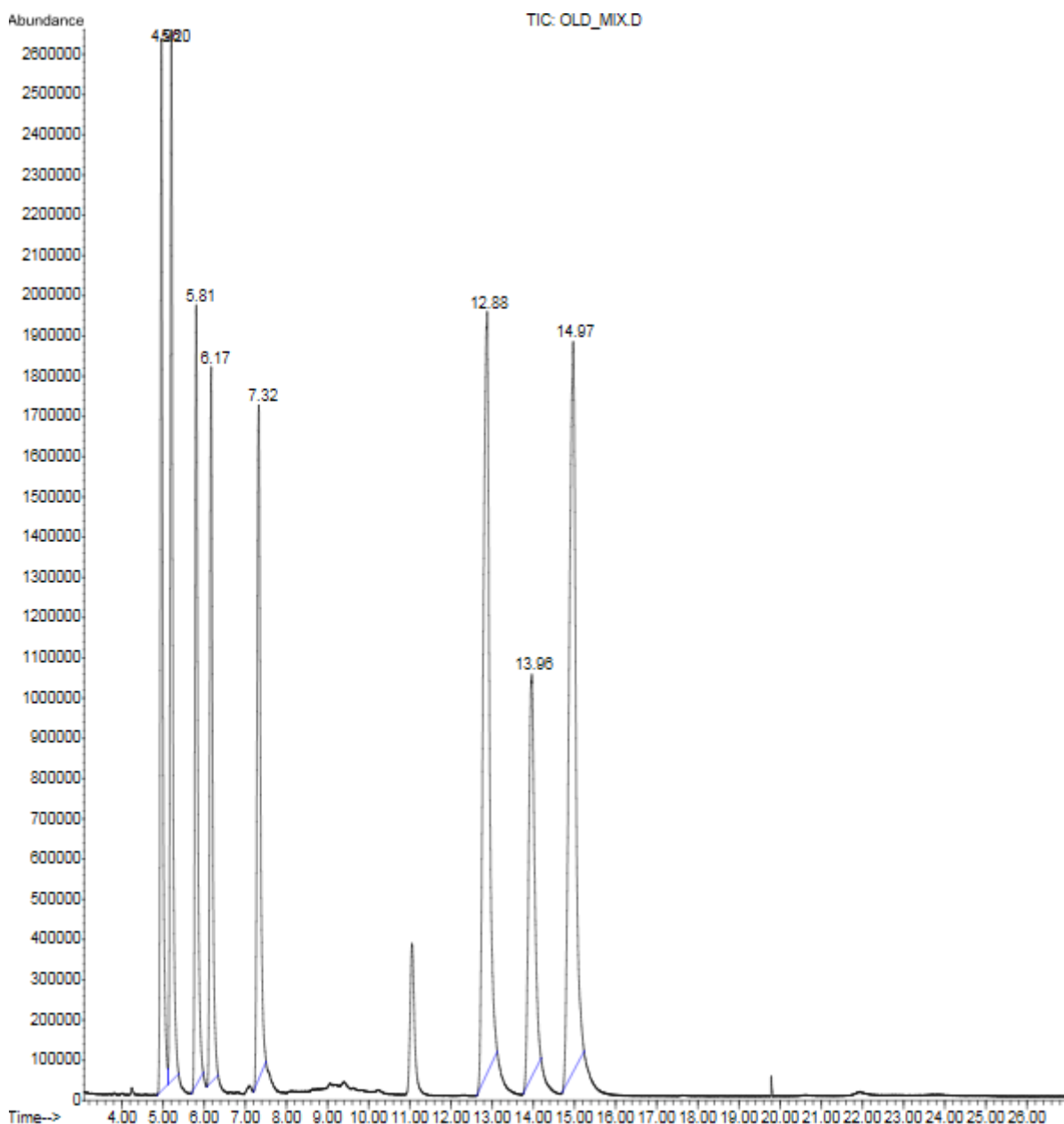


Рис. 4.3. Хроматограма ацетатів поліолів стандартних моноцукрів

Слід зазначити, що серед ідентифікованих цукрів найбільшу частку складали моноцукри, які не були визначені (пік 5) з часом утримання 16,649 хв і (пік 6) - з 58,819 хв (табл. 4.4). Сумарна частка фукози і рамнози складала 23%. Враховуючи, що дані моноцукри не входять до чистих глюкозів, вони можуть утворювати 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 азота і містить специфічні полісахаридні

розгалудження, цілком ймовірно, що рослини здатні їх розпізнавати і розвивати специфічні адаптивні реакції.

Таблиця 4.4

Показники піків на хроматограмі і ідентифікація моноцукрів

№ п/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

Н – не визначені

Ключовими параметрами біологічної активності хітозану є молекулярна маса і ступінь деацетилювання. Як і в багатьох інших полімерів, молекулярна маса хітозану коливається в широких межах від 1-2 кДа в олігомерах до декількох сотень кДа у високомолекулярних формах. Низькомолекулярні форми хітозану здатні проникати в клітини та індукувати зміни в процесах метаболізму. Високомолекулярний хітозан утворює плівку на поверхні інфікованих рослинних тканин і запобігає подальшому поширенню фітопатогенів. Водночас отриманий нами грибний хітозан, окрім глюкозамінів, містить також незначну частку інших цукрів. Методом газової хроматографії проведено дослідження грибного хітозану на наявність у його складі, крім поліглюкозамінів, інших вуглеводних компонентів.

Таким чином, нами з'ясовано, що після кислотного гідролізу в структурі хітозану виявляються незначна кількість пентоз і глюкози, що може свідчити про хімічно гетерогенну, складну, просторово розгалуджену структуру грибного хітозану.

4.2. Підбір і перевірка праймерів для дослідження генів PR-білків рослин

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 (табл. 4.5).

Таблиця 4.5.

Досліджені гени PR-білків модельних культур

<i>N. tabacum</i>	<i>F. ananassa</i>
Референсні гени	
Actin	Actin
Гени PR-білків	
Pathogenesis-related protein PR1 (PR1)	Pathogenesis-related protein 1 (PR1)
Acidic beta-1,3-glucanase gene (PR2a)	Beta-1,3-glucanase (PR2a)
Basic beta-1,3-glucanase gene (PR2b)	Endo-beta-1,4-glucanase (PR2b)
Basic chitinase (PR3a)	Chitinase (chi3) gene (PR3)
Pathogenesis-related protein Q (acidic chitinase) (PR3b)	

Проаналізовано депоновані у Національному центрі біотехнологічної інформації США (*National Center for Biotechnological Information, NCBI*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) нуклеотидні послідовності цих генів та гену актину як референтного маркера. Підбір та визначення термодинамічних показників олігонуклеотидних праймерів проводили за використання програм GeneRunner

(*Hastings Software, США*) та *Primer Express (Applied Biosystems, США)*.

Основними критеріями, за якими обрано праймери були наступні:

- молекулярний розмір PCR-продукту: 50-300 п.н.;
- температура плавлення: 58-65 °C;
- GC склад: 40-60 %;
- якомога менша кількість димерів;
- мінімальна кількість G або C нуклеотидів на 3-кінці праймера (не більше трьох з п'яти останніх нуклеотидів).

За проведеної роботи нами було розроблено олігонуклеотидні праймери, нуклеотидні послідовності яких наведено у таблицях 4.6–4.7. Тестування ефективності ампліфікації, відповідності молекулярному розміру обраних ділянок досліджених генів та оптимізацію умов проведення полімеразної ланцюгової реакції проводили за аналізу геномної ДНК.

Ефективність сайт-специфічної ампліфікації (кількість ПЛР-продукту, присутність неспецифічних бендів) визначається умовами проведення ПЛР та дизайном олігонуклеотидних праймерів. Проведені нами дослідження дозволили визначити чинники, які найбільшою мірою впливали на ефективність ампліфікації, а саме концентрація хлориду магнію, концентрація препарату ДНК, концентрація праймерів у реакційній суміші та кількість циклів ампліфікації.

Таблиця 4.6

Нуклетидні послідовності розроблених праймерів для визначення рівня експресії генів PR-білків *N. tabacum*

Ген	Назва праймеру	Сиквенс 5'→ 3'	Розмір продукту, п. н.	Номер GenBank
Actin	ToAc1	GCCGTGGTGGTGAAAGAG	154	U60489.1
	ToAc2	TGGACTCTGGTGATGGTGTC		
Pathogenesis-related protein, PR1	ToPR1	ACCTGGAGGATCATAGTTGC	191	X12485.1
	ToPR2	GATGTGGGTCGATGAGAA		
Acidic beta-1,3-glucanase gene, PR2a	ToPr3	TGGCTAAGAGTGGAAGGT	211	DQ206348.1
	ToPr4	GCACCATTTGTTGCTCCT		
Basic beta-1,3-glucanase gene, PR2b	ToPr5	TGTTGATGCCATTGTTGGCTTC	241	M59442.1
	ToPr6	CCCTACAGATGCCCCTCCTG		
Basic chitinase, PR3b	ToPr7	TGGTACCAGTGGCGATACCAC	421	S44869
	ToPr8	AGTCGCCGGGGCTACCTT		
Pathogenesis-related protein Q (acidic chitinase), PR3a	ToPr9	GATGACACCACAGGACAACAAG	175	M29868.1
	ToPr10	TCCACTGCGTCATTCCGTC		

Таблиця 4.7

Нуклеотидні послідовності розроблених праймерів для визначення рівня експресії генів PR-білків *F. ananassa*

Ген	Назва праймеру	Сиквенс 5'→ 3'	Розмір продукту, п. н.	Номер GenBank
Actin	FrAc1	TCGGTGACGAGGCTCAATC	194	AB116565.1
	FrAc2	GGCCTCAGTTAGGAGAACTGG		
Pathogenesis-related protein 1, PR-1	FrPr17	ACATGGGATGCCAATCTAGC	186	AB462752.1
	FrPr18	CCACAGGTTACAGCAGATG		
Beta-1,3-glucanase, PR2a	FrPr13	TATGGACGAAACGGTGACAA	208	AY989819.1
	FrPr14	AGGGTTGCACATTTTCTGG		
Endo-beta-1,4-glucanase, PR2b	FrPr11	GCTAAACGCCAGGTGGATTA	236	AJ006348.1
	FrPr12	AAATGCATCCGAGCTATTGG		
Chitinase (chi3) gene, PR3	FrPr15	ACCAAGTTCAGCTCGCAGAT	162	AF134347.1
	FrPr16	TCCTAATGGCCTTGAAGTGG		

З огляду на це, для кожного з використаних праймерів було підібрано оптимальні умови проведення ПЛР, які уможливлювали отримання чітких ампліконів визначеного молекулярного розміру без додаткових неспецифічних продуктів ампліфікації (рис. 4.4, рис. 4.5).

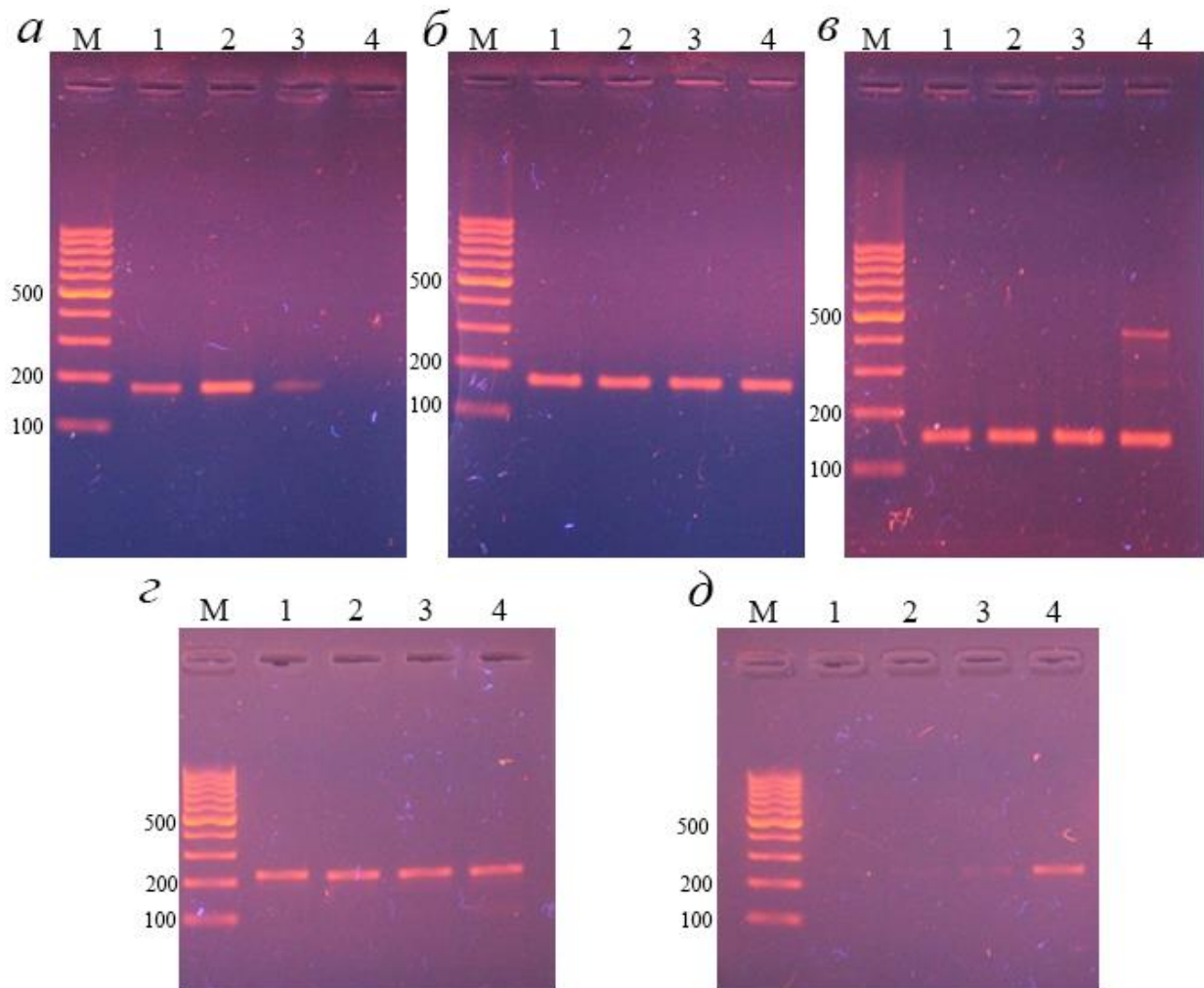


Рис. 4.4. Визначення специфічності розроблених праймерів генів PR-білків *F. ananassa*: а – актин; б – PR-1; в – хітиназа; г – β -1,3-глюканаза; д – енд- β -1,4-глюканаза. Температури плавлення: 1 – 65 °C; 2 – 60 °C; 3 – 55 °C; 4 – 50 °C; М – маркер молекулярних розмірів (Gene Ruller 100 bp).

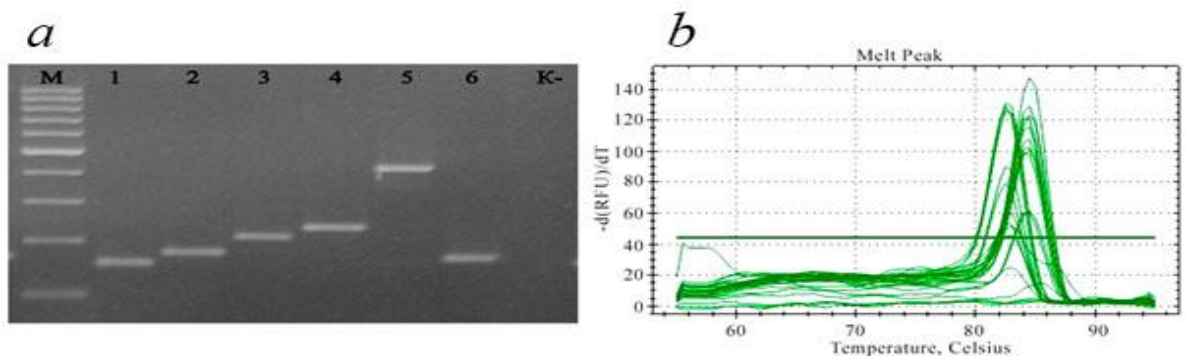


Рис. 4.5. Визначення специфічності розроблених праймерів: а) електрофоретичне розділення продуктів генів PR-білків *N. tabacum*: М – маркер молекулярних розмірів (Gene Ruller 100 bp), 1 – актин; 2 – PR-1; 3 – PR2a; 4 – PR2b; 5 – PR3b 6 – PR3a; К⁻ – негативний контроль. б) Криві плавлення ПЛР продуктів генів PR-білків на прикладі *N. tabacum*.

Отже, враховуючи подальше використання обраних ділянок PR-генів для аналізу їх експресії під впливом абіотичних чинників, відсутність неспецифічної реакції є ключовим елементом для проведення кількісного визначення за використання інтеркалюючих барвників.

4.3. Вплив препаратів хітозану різного біологічного походження на експресію генів PR-білків модельних культур

За результатами проведених досліджень впливу розчинів хітозану на модельні рослини тютюну звичайного та суниці садової детектовано експресію всіх генів PR-білків. При цьому рівень відносної експресії зазначених генів значно варіював залежно від біологічного походження хітозану, часу після обробки та самого гена (рис. 4.6).

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 НМХ був вищим порівняно з ВМХ за винятком гена PR-1, експресія якого практично не змінювалася за весь час експерименту.

Даний ефект свідчить про різний характер реакцій відповіді рослинного організму на стимули. Враховуючи, що концентрації і умови обробки поверхні листків діючими речовинами були однаковими, є підстави вважати, що вирішальне значення для рослин має ступінь полімеризації хітозанів, тобто довжина поліамінних ланцюгів і їх біологічне походження. Незалежно від походження препарату полісахариду з потенціальними елісаторними

властивостями найменший вплив здійснювався на експресію гена PR-1, а найбільший – на експресію глюканаз (PR-2a та PR-2b).

Білки PR-1 є стійкими до протеаз і виявляються в рослинних тканинах, що уражені вірусами, бактеріями і грибами [93, 159]. 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. До того ж відомо, що експресія генів стійкості PR-1 пов'язана з активацією Са-залежних протеїніназ.

В стресових умовах це відбувається через збільшення у клітинах концентрації оксид азоту (NO) [151]. У клітинах рослин NO задіяний у широкому спектрі захисних реакцій, включаючи патогенез [136]. За умов активації відповідних сенсорних систем транскрипційна відповідь рослин на обробку листків розчинами хітозанів мала відбутися протягом доби. Так, відомо, що підвищення синтезу NO у незаражених листках *Lycopersicon esculentum* спостерігалось вже за 12 годин після інокуляції рослин вірусом тютюнової мозаїки [164]. За умов, коли еліситор (у нашому експерименті – BMX і НМХ) взаємодіє з мішенями рослинної клітини, відповідна фізіологічна реакція відбувається достатньо швидко.

Встановлено, що за обробки НМХ 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. 4.6, а). За обробки рослин BMX 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. 4.6, б).

У рослин суниці садової за обробки НМХ 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. 4.6, в). Подібну експресію генів, пов'язаних з патогенезом, з незначними відмінностями, спостерігали також і після обробки рослин високомолекулярним хітозаном (рис. 4.6, г).

.

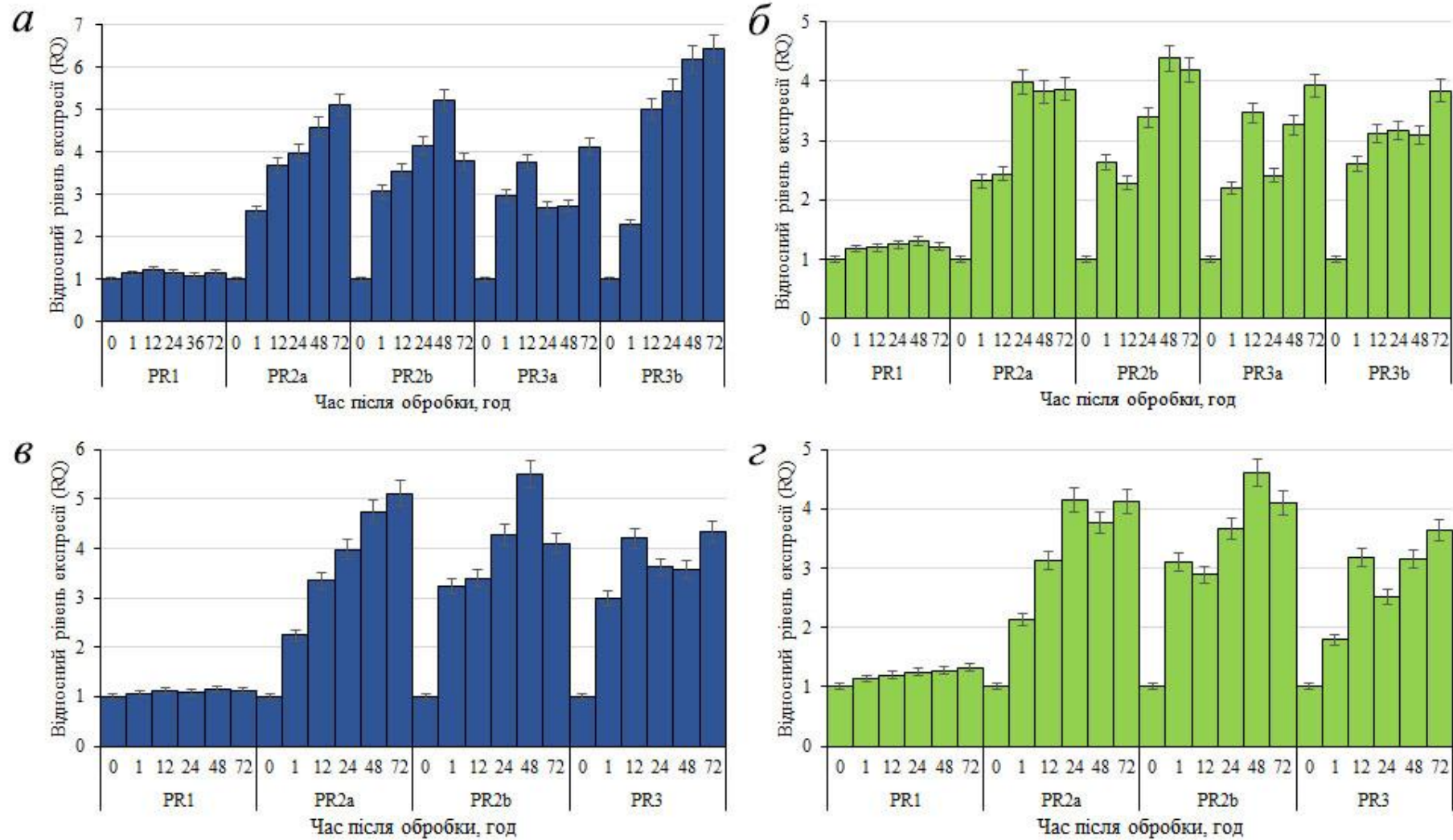


Рис. 4.6. Відносний рівень експресії (RQ) досліджених генів PR-білків: а, в, - *N. tabacum*, б, г – *F. ananassa* відносно референтного гену актину: а, б – обробка препаратом НМХ, в, г – ВМХ

Переважна кількість β -1,3-глюканаз – ендоглюканази, які здатні розщеплювати клітинну стінку грибів [250]. Експресія генів PR-2а обумовлена здатністю НМХ взаємодіяти з сенсорними системами клітин. У рослин патогенез зазвичай відбувається на тлі підкислення цитоплазми. Підвищення концентрації протонів призводить до розвитку реакцій окиснювального стресу і накопичення захисних білків [273]. Рух низькомолекулярних глюкозамінів по апопласту призводить до поширення еліситорів і включення до захисних реакцій дедалі більшого об'єму рослинних тканин. Оскільки міжклітинне середовище у стресових умовах поступово стає більш лужним, створюються умови оптимальні саме для основних хітиназ. Саме цей клас PR-білків представляє найефективнішу захисну систему, яка руйнує клітини фітопатогенних грибів.

Отримані результати підтверджують чутливість захисних систем рослин до хітозану, його здатність проникати у тканини і взаємодіяти з відповідними клітинними сенсорами. Слід відмітити, що характер такої взаємодії може суттєво різнитися залежно від відповідного гена-мішені, походження та молекулярної маси хітозану.

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.

Висновки до 4 розділу:

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. Проаналізовано нуклеотидні послідовності генів PR-білків модельних рослин та підібрано праймери для постановки ПЛР, оптимізовано процедуру

виділення РНК з модельних рослин та процедуру постановки ПЛР для визначення експресії генів PR-білків.

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 зростав 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.

Матеріали розділу опубліковано у працях [42, 43, 149, 293]

РОЗДІЛ 5.

СПЕЦИФІКА ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИН МОДЕЛЬНИХ КУЛЬТУР ЗА ДІЇ НА ОБРОБКУ ХІТОЗАНАМИ ГРИБНОГО І ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

5.1. Вплив хітозанів на динаміку синтезу та акумуляцію фенольних сполук в листках *Fragaria ananassa* Duch.

Дослідження метанольних екстрактів листків *F. ananassa* методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) дозволило виявити 9 основних компонентів, зокрема гідролізовані таніни, похідні галової, елагової кислот і флавоноїди. За часом утримання і характерним УФ спектрами серед інших фенольних речовин були ідентифіковані 2,3-S-гексагідроксидифеніл D-глюкоза (ГГДФ-глюкоза) (пік 1), галоїлхінна кислота (пік 2), пентозид елагової кислоти (пік 5,6), глікозиди кемпферола (пік 9), елагова кислота (пік 8), тілірозид (пік 10), елаготаніни (піки 3, 4, 7) (рис. 5.1-5.3).

Слід зазначити, що компонентний склад фенолів у листках *F. ananassa* досить стабільний. Серед досліджуваних речовин ГГДФ-глюкоза (пік 1) і глікозид кемпферола (пік 9) характеризувались накопиченням найбільшою кількістю в листках.

Після обробки листків НМХ і ВМХ вже через 1 год у них істотно збільшувався вміст елагової кислоти. При цьому, вже через 12 году її кількість дещо зменшувалася. Слід зазначити, що тенденція до плавного збільшення вмісту елагової кислоти в листках в нічний час доби з подальшим зниженням її кількості в денний період, виявлена тільки у контрольних рослин. Обробка рослин хітозанами викликала стрибкоподібне збільшення її кількості в листках суниці садової (табл. 5.1).

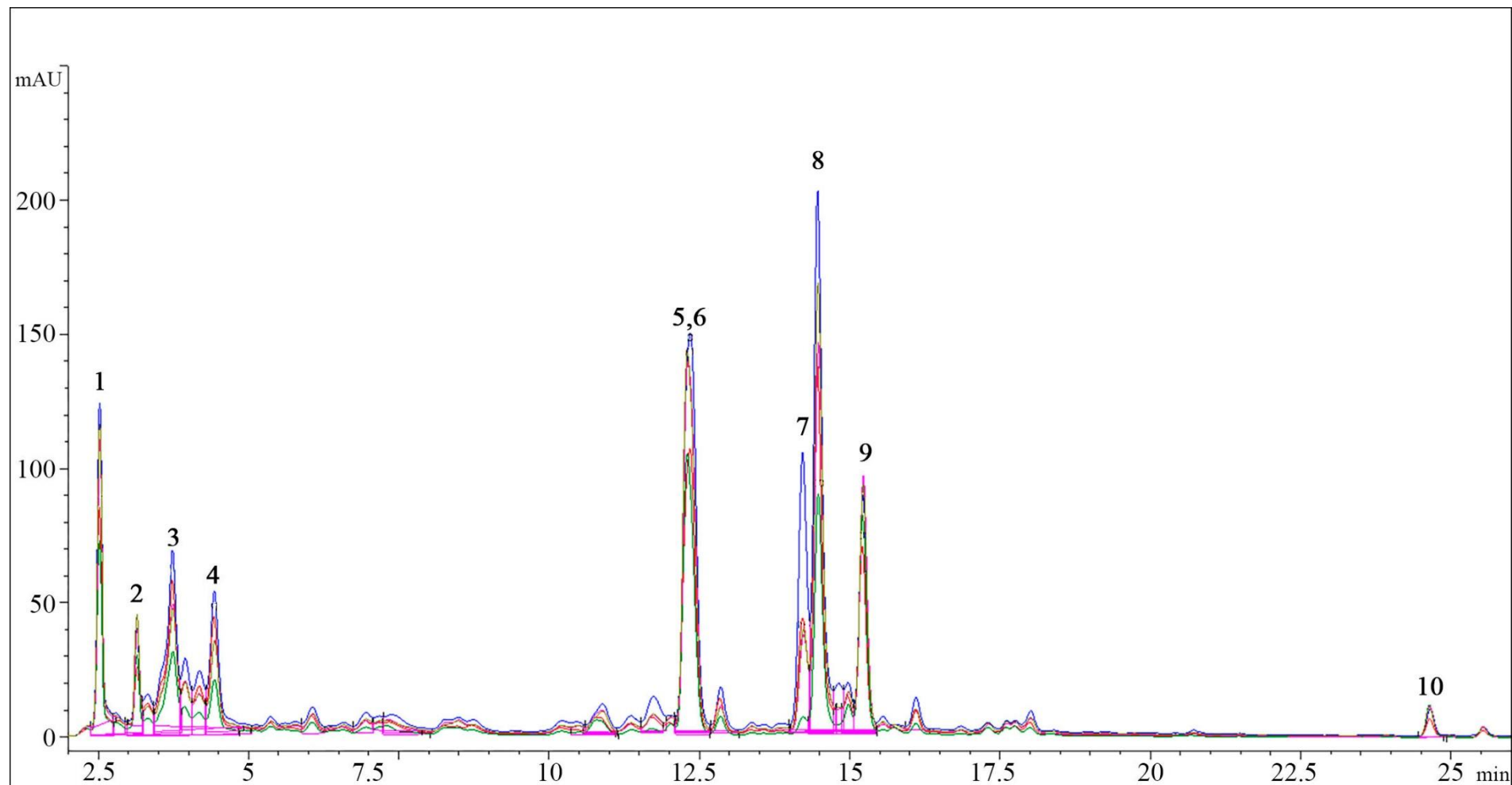


Рис. 5.1. Зведені (0-48 год) ВЕРХ-хроматограми листків *F. ananassa*, контроль: 1 – 2,3-*S*-гексагідроксидифеніл D-глюкоза; 2 – галоїлхінна кислота; 3 – елаготанін; 4 – елаготанін; 5, 6 – пентозид елагової кислоти; 7 – елаготанін; 8 – елагова кислота; 9 – глікозид кемпферола; 10 – тілірозид.

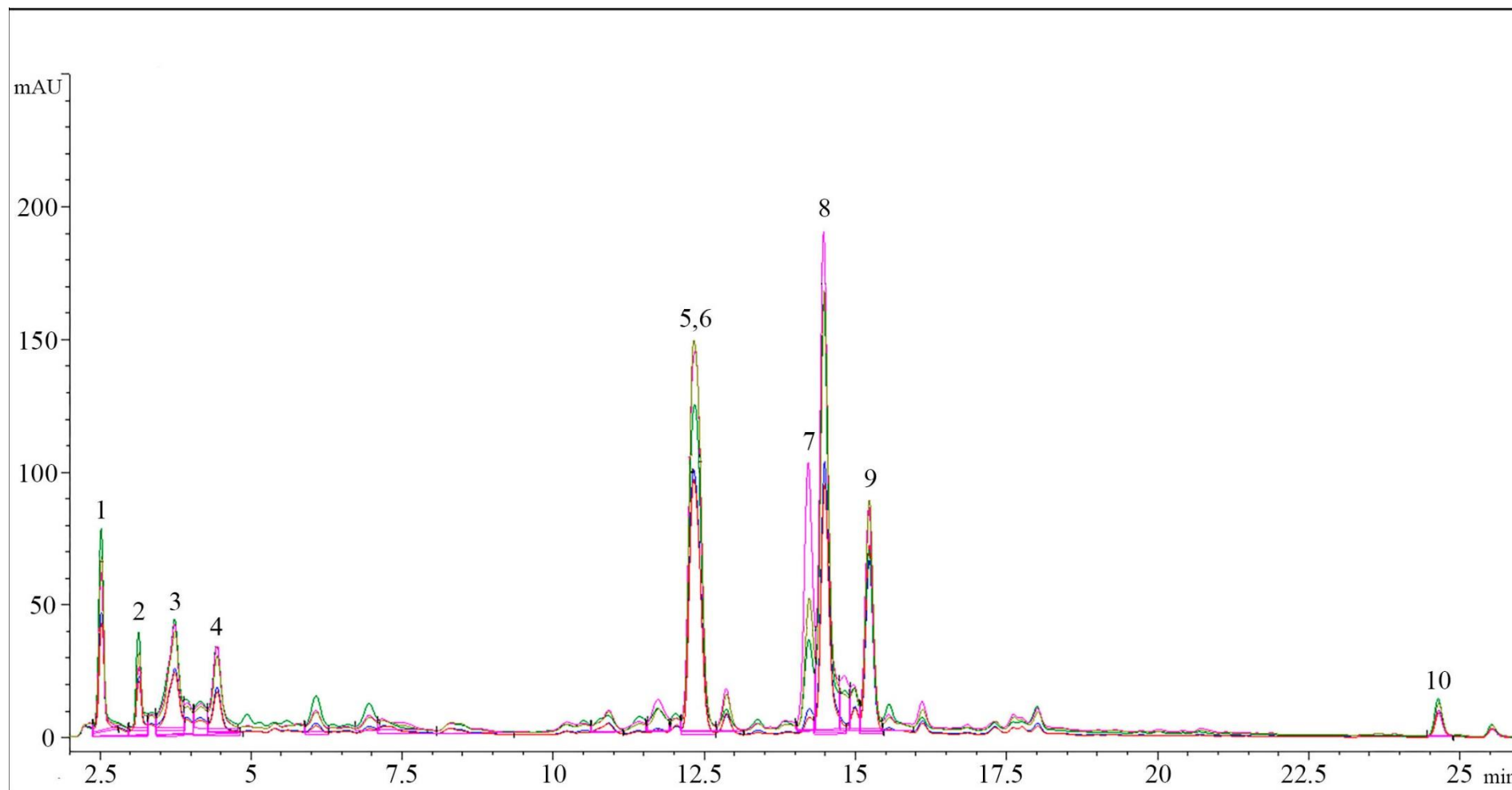


Рис. 5.2. Зведені (0-48 год) ВЕРХ-хроматограми листків *F. ananassa*, оброблених 0,4% розчином низькомолекулярного хітозану: 1 – 2,3-*S*-гексагідроксидифеніл D-глюкоза; 2 – галоїлхінна кислота; 3 – елаготанін; 4 – елаготанін; 5, 6 – пентозид елагової кислоти; 7 – елаготанін; 8 – елагова кислота; 9 – глікозид кемпферола; 10 – тілірозид.

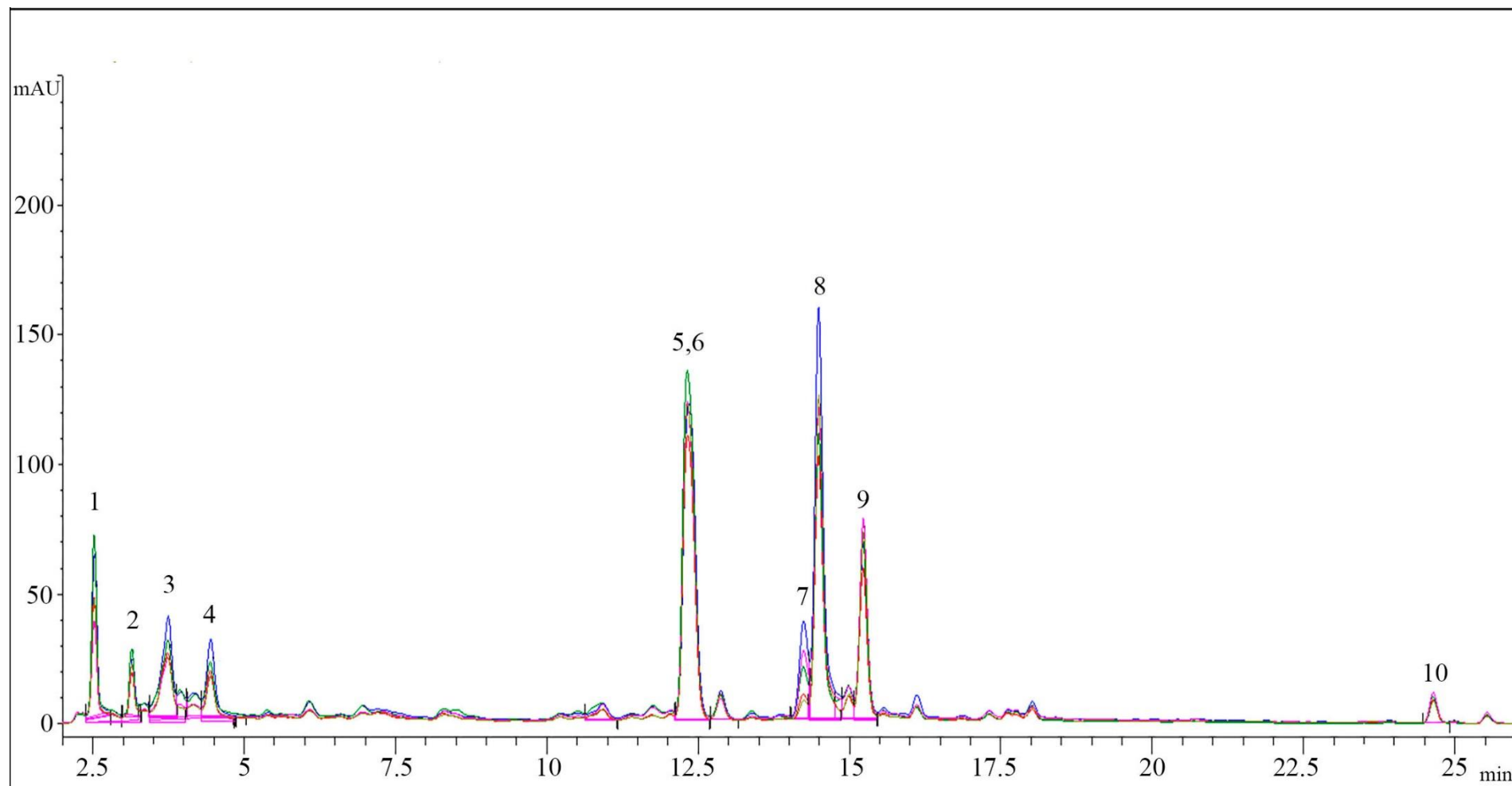


Рис. 5.3. Зведені (0-48 год) ВЕРХ-хроматограми листків *F. Ananassa*, оброблених 0,4% розчином високомолекулярного хітозану: 1 – 2,3-S-гексагідроксидифеніл D-глюкоза; 2 – галоїлхінна кислота; 3 – елаготанін; 4 – елаготанін; 5, 6 – пентозид елагової кислоти; 7 – елаготанін; 8 – елагова кислота; 9 – глікозид кемпферола; 10 – тілірозид.

Таблиця 5.1

Вплив НМХ та ВМХ на вміст фенольних сполук в листках *F. ananassa*

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
НМХ	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
ВМХ	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

A – ГГДФ-глюкоза; B – Галоїлхінна кислота; C – Елаготанін; D – Елаготанін; E – Пентозид елагової кислоти та глікозид кемпферола; F – Елаготанін; G – Елагова кислота; H – Глікозид кемпферола, I – Тілірозид. **Напівжирним виділені максимальні значення.**

Примітка: достовірну різницю відносно до контролю оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу, а - достовірна різниця при P <0,05, b – достовірна різниця при P <0,01.

Необхідно зазначити, що вміст окремих індивідуальних компонентів і загальна кількість фенольних сполук у листках *F. ananassa* є досить варіабельним показником. Так, коефіцієнт варіації загального вмісту фенолів становив - 50,1%, при цьому в межах сорту найбільші відмінності спостерігались для ГГДФ-глюкози (пік 1 на рис. 5.1-5.3) та елаготанінів (піки 3, 4 і 7). Проведені дослідження дозволили виявити добову динаміку якісного і кількісного складу елаготанінів і флавоноїдів в листках суниці садової.

Добові коливання індивідуальних фенольних сполук найбільш чітко виражені в групі елаготанінів (піки 3, 4 і 7), а також для кемпферол-3- β -D-[6-O-(E)-кумароїл]-глюкопіранозиду (тілірозид) (пік 10). Найбільш стабільними показниками в листках даного сорту були вміст глікозиду кемпферола (пік 6, 9) та пентози елагової кислоти (пік 5).

При аналізі комплексу фенолів методом головних компонент (PCA) перша вісь (F1) склала 96,53% від загальної дисперсії ознак (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

PCA-аналіз виявлених фенольних речовин в листках *F. ananassa*

№	Compound	Контроль		HMX		BMX	
		Factor scores					
		F1	F2	F1	F2	F1	F2
Пік 1	ГГДФ-глюкоза	0,426	0,334	-0,701	0,545	-0,888	1,017
Пік 2	Галоїлхінна кислота	-1,443	0,037	-1,212	-0,255	-0,983	-0,182
Пік 3	Елаготанін	-0,056	-0,738	-0,226	0,886	-1,439	-0,056
Пік 4	Елаготанін	-1,183	-0,180	-1,351	-0,213	-1,274	-0,096
Пік 5,6	Пентозид елагової кислоти Глікозид кемпферола	-0,811	0,131	-0,519	-0,547	-0,270	-0,238
Пік 7	Елаготанін	-1,328	-0,166	-0,866	0,584	-1,423	0,004
Пік 8	Елагова кислота	-0,669	0,313	-0,696	-0,242	0,065	-0,145
Пік 9	Глікозид кемпферола	0,104	0,106	0,814	-0,997	1,657	-0,426
Пік 10	Тілірозид	-1,355	0,167	-1,390	0,083	-1,455	-0,060
Загальна кількість		6.315	-0,005	6,145	0,157	6,010	0,182

Вагомий вклад у загальну дисперсію внесли показники вмісту галоїлхіної кислоти, тілірозиду та пентозиду елагової кислоти. Дещо менше значення мали показники кількості елаготаніну (пік 7) та елагової кислоти (пік 8).

У контрольній групі з комплексу показників вісь F1 розділила основні індивідуальні фенольні сполуки листків суниці садової від їх загальної кількості. Відносно стабільним в листках виявився вміст глікозиду кемпферола.

Друга вісь головних компонент (F2) становила 1,74% від загальної дисперсії, в якій найбільше значення було по елаготаніну (пік 3). У групі досліджуваних фенольних речовин сумарна дисперсія 1 і 2 головних компонент становила 98,27%. Це дозволило додатково застосувати Biplot-аналіз (рис. 5.4).

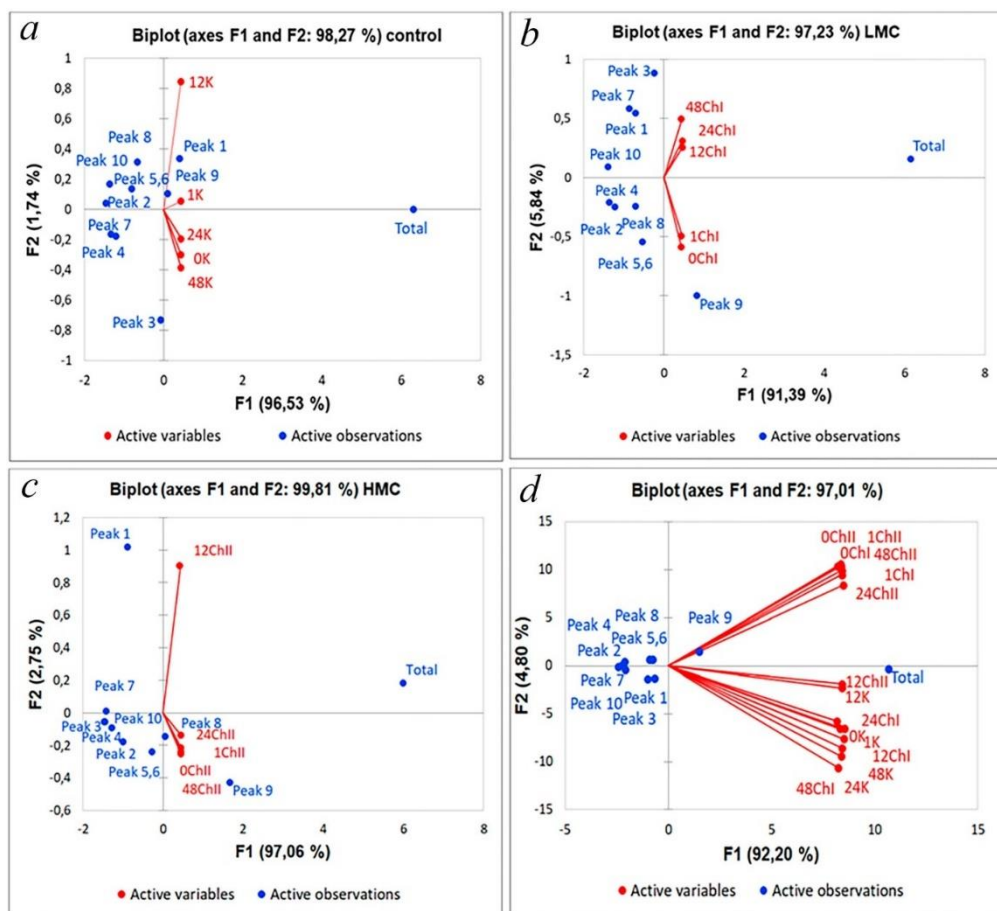


Рис. 5.4. Biplot-аналіз головних компонент по показникам вмісту фенольних речовин в листках *F. ananassa*: а) контроль; б) НМХ; с) ВМХ; д) зведені дані(К – контроль; ChI – НМХ; ChII – ВМХ).

Відносно осей F1 і F2 характер групування показників за часом відбору зразків вказав на добову динаміку концентрації окремих фенольних компонентів. Так по осі F2 розділилися показники вмісту фенолів у вечірній (0 год, 24 год, 48 год) і ранковий (12 год) час доби. Найбільш вираженим було збільшення вмісту в листках ГГДФ-глюкози, галоїлхіної кислоти, пентозиду елагової кислоти, глікозиду кемпферола та елагової кислоти в ранкові години з подальшим зниженням у вечірній і нічний час доби.

Встановлена природна динаміка вмісту даних фенольних сполук описується логістичною кривою виду:

$$f(y) = y_0 + \frac{a}{x} \cdot \exp \left(-0.5 \cdot \left(\frac{\ln \frac{x}{x_0}}{b} \right)^2 \right) \quad (5.1)$$

Дана математична модель досить точно описує динаміку процесу, однак, передбачуване збільшення вмісту кемпферола та елагової кислоти в нічний час доби потребує експериментального підтвердження (рис. 5.5).

У контрольної групи рослин множинний кореляційний аналіз підтвердив тісний прямий зв'язок (коефіцієнт кореляції Пірсона $r = 0,90$) між кількістю в листках елагової кислоти, ГГДФ-глюкози та галоїлхіної кислоти. Обернена кореляційна залежність (коефіцієнт кореляції Пірсона $r = -0,90$) виявлена між показниками кількості елагової кислоти і елаготаніну (пік 7). Проте, у зв'язку з тим, що концентрація останнього в метанольних екстрактах на порядок менша, розглядати такий взаємозв'язок, як значущий і метаболічно пов'язаний досить складно.

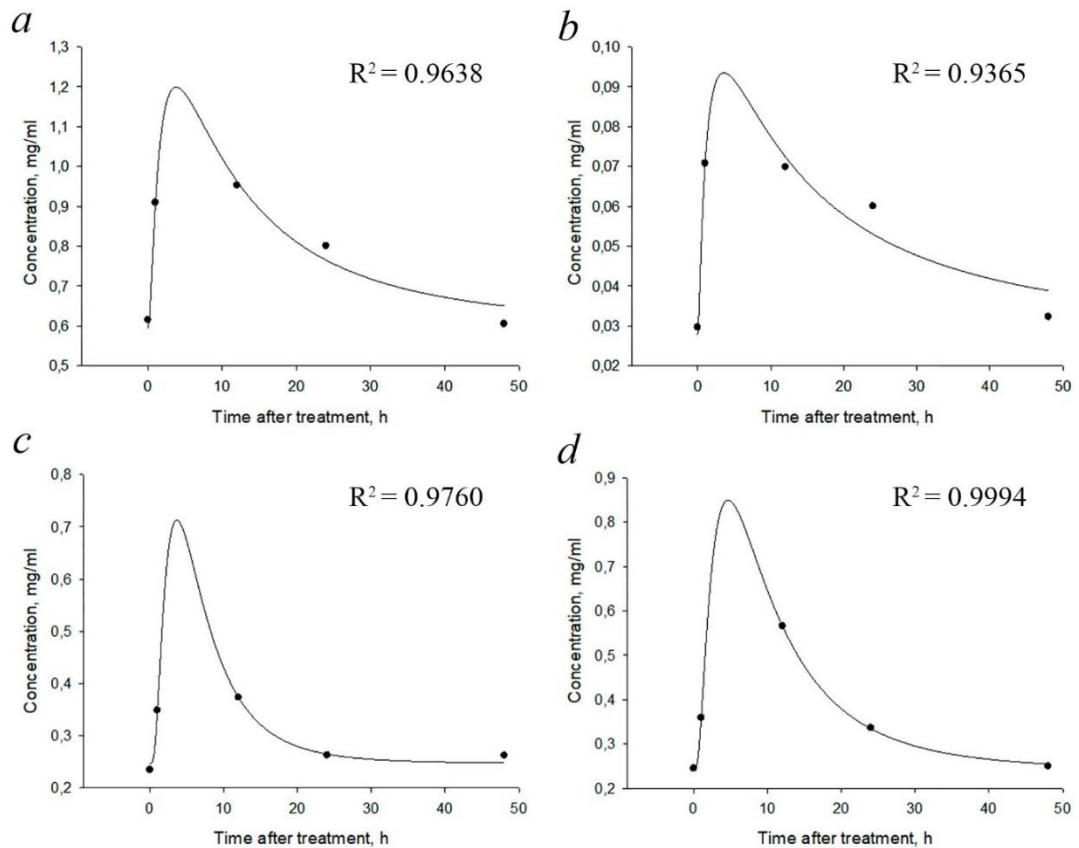


Рис. 5.5. Динаміка вмісту ГГДФ-глюкози (а), галоїлхіної кислоти (б), пентозида елагової кислоти, глікозиду кемпферола (с) та елагової кислоти (д) в листках *F. ananassa*.

Таким чином, встановлені фізіологічні особливості підтверджують наявність добових коливань в накопиченні фенольних речовин у вегетативних та генеративних частинах рослин. У той же час, у різних видів рослин добова динаміка вмісту фенольних речовин може істотно відрізнятися. Вона також може змінюватися під дією значних зовнішніх стимулів на рослини.

Це підтверджують відмінності у вмісті окремих фенольних компонентів і їх загальної кількості протягом двох діб під дією розчинів низькомолекулярного і високомолекулярного хітозанів. Відповідна реакція рослин на одноразову обробку 0,4% низькомолекулярним хітозаном супроводжувалася істотним зменшенням вмісту елагової кислоти, після незначного збільшення концентрації в першу годину після обробки (рис. 5.6,

а). Протилежний ефект спостерігався у рослин після їх обробки високомолекулярним хітозаном (рис. 5.6, б)

Найбільш сильною відповіддю рослин на обробку листків низько- і високомолекулярних хітозаном було значне збільшення в листі вмісту ГГДФ-глюкози. В обох варіантах пік максимуму припадав на 12 годину після обробки (рис. 5.6, в, г). Динаміка цього процесу описується модифікованою функцією Гауса:

$$f(y) = a \cdot e^{\left[-0.5 \cdot \left(\frac{x - x_0}{b} \right)^2 \right]} \quad (5.2)$$

З різким збільшенням в тканинах листків вмісту ГГДФ-глюкози підвищується не тільки антиоксидантний, але й також і прооксидантний потенціал рослин, що забезпечує готовність рослинного організму протидіяти зовнішнім негативним факторам.

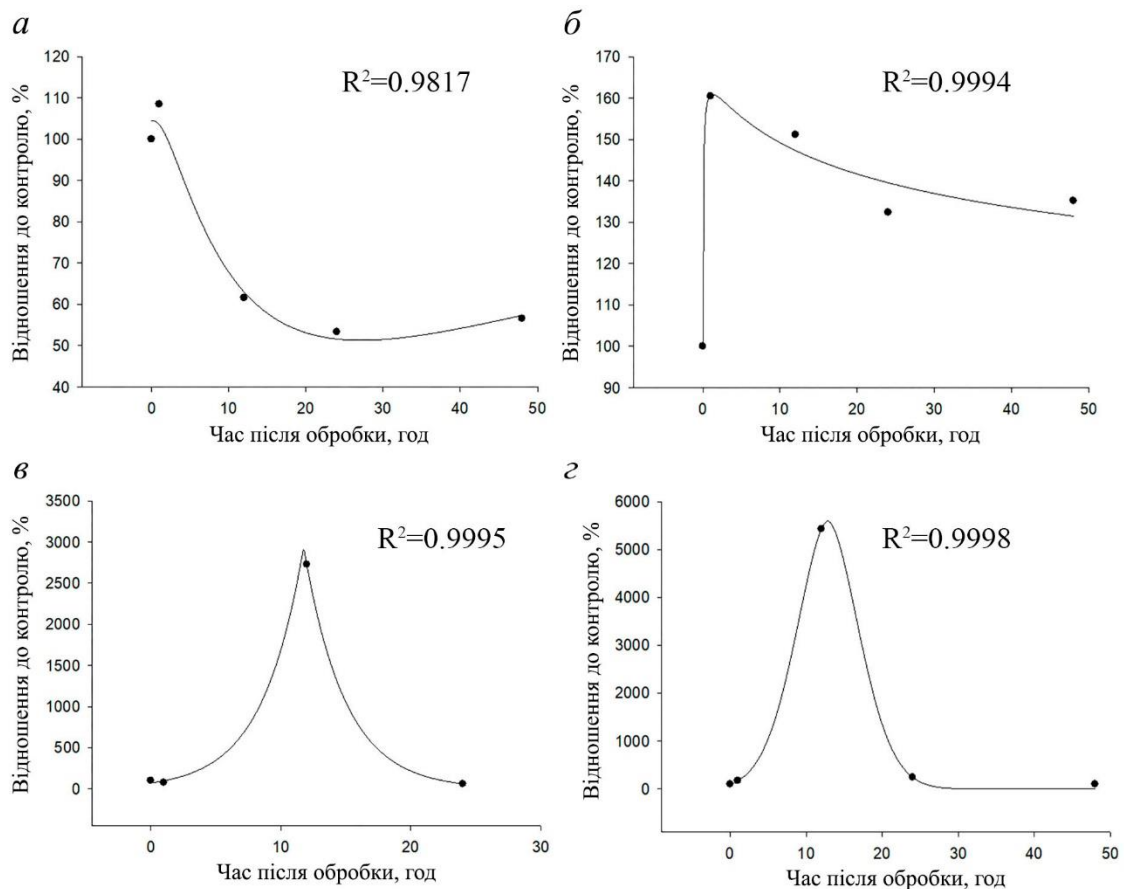


Рис. 5.6. Динаміка вмісту асорової кислоти (а, б) та ГГДФ-глюкози (в, г) в листках *F. ananassa* після обробки НМХ (а, в) та ВМХ (б, г).

На думку J-P. Salminen, ефективність захисних функцій елаготанінів вища, ніж у галотанінів. Це пояснюється здатністю елаготанінів утворювати о-хінони з вираженими електрофільними властивостями. Також антифідантна активність танінів, що заснована на осадженні білків, посилюється їх прооксидантною активністю особливо в слаболужних умовах [278].

У синтезі танінів першими в клітинах рослин утворюються полігалоїлглюкози з відносно невисоким прооксидантним потенціалом. Подальше перетворення галотанінів в елаготаніни призводить до підвищення загальної прооксидантної активності клітин. Кількісні зміни концентрації елаготанінів суниці садової у відповідь на дію хітозанів також передбачають активацію відповідних ферментних систем. Елаготаніни в тканинах рослин піддаються ферментативному гідролізу. Елагова кислота утворюється в результаті лактонізації гексаоксидіфенової кислоти, яка вивільняється при гідролізі елаготанінів. Збільшення загального пулу елагової кислоти передбачає збільшення інтенсивності окислювальних процесів в тканинах рослин. Оскільки при інфікуванні фітопатогенними грибами в рослинах відбувається накопичення елагової кислоти [322], різке підвищення її концентрації після обробки ВМХ може вказувати на проявлення його елісаторної активності з активацією відповідних гідролаз. Протилежний ефект, виявлений нами після обробки рослин хітозаном грибного походження (НМХ), що, ймовірно, обумовлений меншою масою олігомерів і більш високим ступенем їх деацетилювання. Відомо, що елісаторна активність хітозану суттєво залежить від кількості ацильних груп. Існують дані, що олігомери хітину в листках пшениці підвищують активність пероксидаз, тоді як хітозан підвищує активність пероксидаз і фенілаланін-амоній-ліаз, деацетилюваний хітозан прискорює утворення лігніну [314]. Повністю деацетилювані олігомери індукують хітиназну активність в клітинах рису [192], а також фенілаланін-аммоній- і тирозин-амоній-ліази в листках сої [198]. При цьому швидкість відповідних фізіологічних реакцій у рослин може

істотно відрізнятись. При елісаторній активації NO-синтази активність PR-1 білків і фенілаланін-аміак-ліази підвищується менш ніж через 24 години [36, 74]. Нами важливі фізіологічні зміни під впливом хітозанів виявлено вже в перші 12 год після обробки рослин, що засвідчує про значущість використаних в експерименті молекулярних сигналів для рослинного організму.

Підвищення вмісту в листках ГГДФ-глюкози, галоїлхіної, елагової кислот та пентозиду елагової кислоти в нічний час доби, можливо, пов'язано зі специфікою фенольного синтезу, а також з тим, що зниження температури з одночасним підвищенням вологості повітря вночі сприятливі для росту більшості фітопатогенних грибів. Що, відповідно, збільшує ризик інфікування рослин. Синтез фенольних речовин дозволяє виробити конститутивну стійкість, яка забезпечується, в тому числі механічною міцністю і здатністю клітинних стінок протидіяти негативним факторам середовища. Полімеризовані елаготаніни в своїй більшості є середньо- або мало полярними сполуками. Частина їх ковалентно зв'язується з компонентами клітинних стінок рослин. Збільшення вмісту поліфенольних компонентів в складі клітинної стінки відбувається за участю пероксидазної системи і супроводжується активацією ферментів фенілпропаноїдного метаболізму, що беруть участь в утворенні оксикоричних спиртів та інших складових лігніну, необхідних для стійкості рослинного організму.

5.2. Особливості реалізації системної стійкості у модельних культур після обробки хітозаном

Рослини *F. ananassa* накопичують у листках гідролізовані таніни (ГГДФ-глюкоза, агрімоніїн, 1-О-галоїлглюкоза), глікозиди кемпферолу та кверцетину, які виконують захисні та регуляторні функції.

Методом високоефективної рідинної хроматографії виявлено гало- та елаготаніни, як найбільш динамічну групу в листках суниці садової. ВЕРХ аналіз ідентифікував елагову кислоту (а), ГГДФ-глюкозу (b), глюкоронид

кемпферола (с), галохінну кислоту (d) та інші сполуки елагітанінного та флавоноїдного походження (рис.5.7).

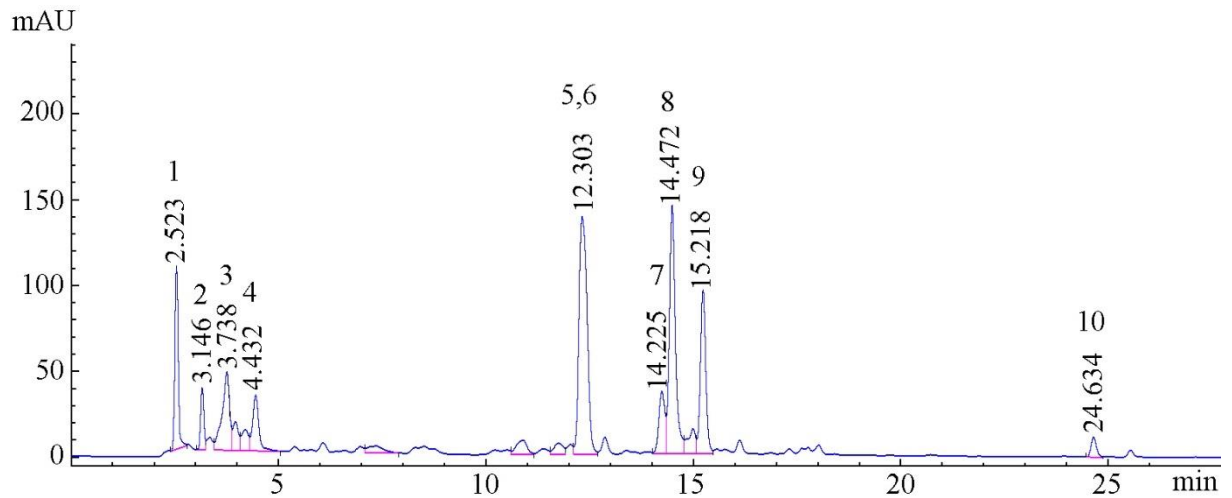


Рис. 5.7. ВЕРХ-профіль листків суниці садової до обробки хітозаном: 1 – 2,3-*S*-гексагідроксифеніл D-глюкоза; 2 – галоїлхінна кислота; 3 – елаготанін; 4 – елаготанін; 5, 6 – пентозид елагової кислоти; 7 – елаготанін; 8 – елагова кислота; 9 – глікозид кемпферола; 10 – тілірозид.

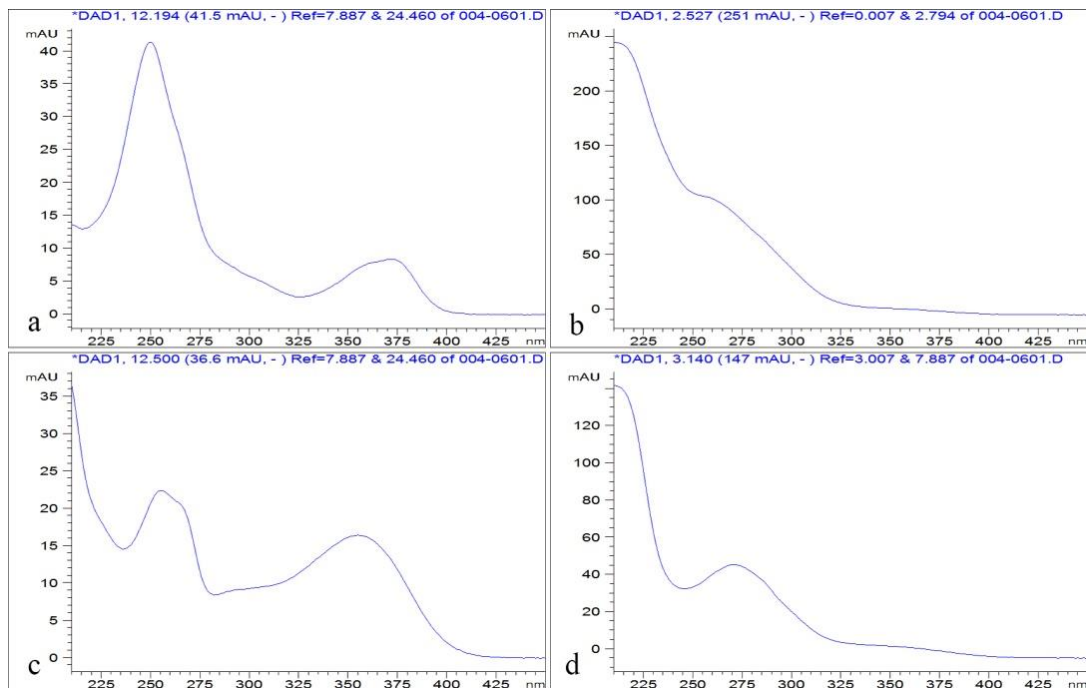


Рис. 5.8. УФ-спектри базових фенольних сполук суниці садової сорту Аліна на стадії адаптації до умов *in vivo*

У дослідженні реакцій відповіді рослин *F. ananassa* на обробку хітозаном різного походження та молекулярної маси в якості основних показників використовували вміст фенолів, катехінів, флавоноїдів і загальний антиоксидантний потенціал вторинних метаболітів. Після одноразової обробки листків 0,4% розчином хітозану (препарати - НМХ і ВМХ) спостерігали динаміку вмісту фенольних сполук у листках. Контрольні рослини обробляли водою. Встановлено, що у контрольної групи рослин показники вмісту фенольних речовин в перші години знижувалися. Цей ефект, можливо, пов'язаний зі зниженням температури і інтенсивності транспірації після обробки надземної частини рослин водою. Крім того, оскільки обробку *F. ananassa* проводили у вечірній час, зниження вмісту фенольних речовин було наслідком природних циркадіанних ритмів. Добові коливання загального вмісту фенольних речовин, можуть бути пов'язані з їх природною полімеризацією і інтеграцією в клітинні стінки в якості складових компонентів лігніну і суберину.

Обробка рослин *F. ananassa* хітозаном показала високу реактивність відповідних фізіологічних реакцій. Дія низькомолекулярного хітозану активізувала фенілпропаноїдний 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 годин кількість загальних фенолів і антиоксидантів збільшувалася в 1,9 і 3,2 рази відповідно. Досить інтенсивна реакція свідчить про високу біологічну активність хітозану, який було отримано з плодових тіл грибів.

Динаміка зміни вмісту фенолів і антиоксидантів у листках описувалася логістичною функцією типу:

$$f(y) = y_0 + a \times \exp\left(-\frac{1}{2x} \times \left(\frac{\ln \frac{x}{x_0}}{b}\right)^2\right) \quad (5.3)$$

Дане рівняння з високою точністю (R^2) описувало природну динаміку і відповідні фізіологічні реакції рослин.

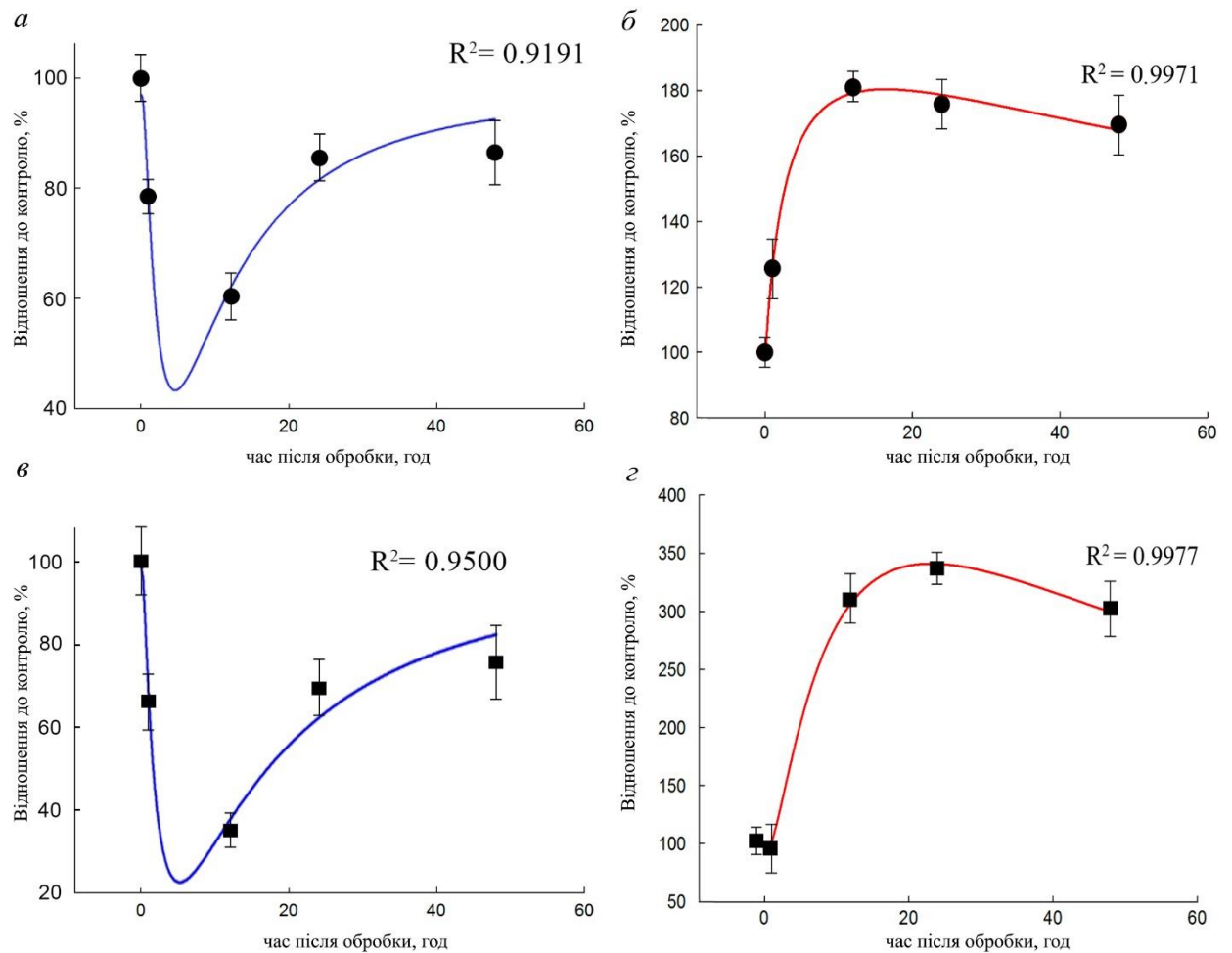


Рис. 5.9. Динаміка вмісту в лисках *F. ananassa* фенольних сполук (а, б) та антиоксидантної активності (в, г) після обробки: а, в – водою (контроль); б, г – низькомолекулярним хітозаном. Початковий показник (до обробки) дорівнює 100%.

На відміну від низькомолекулярного хітозану, розчин високомолекулярного полімеру викликав у листках різке зниження вмісту вільних і слабкозв'язаних з клітинними стінками фенольних сполук. Швидкість зниження вмісту вільних фенольних сполук і антиоксидантів у листках в першу годину після їх обробки високомолекулярним хітозаном відбувалося лінійно (рівняння 2 і 3 відповідно):

$$y = 100 - 47,2590x \quad (2)$$

$$y = 100 - 37,2661x \quad (3)$$

Подальша динаміка описувалася логнормальною залежністю, яка була характерна для рослин, оброблених низькомолекулярним хітозаном.

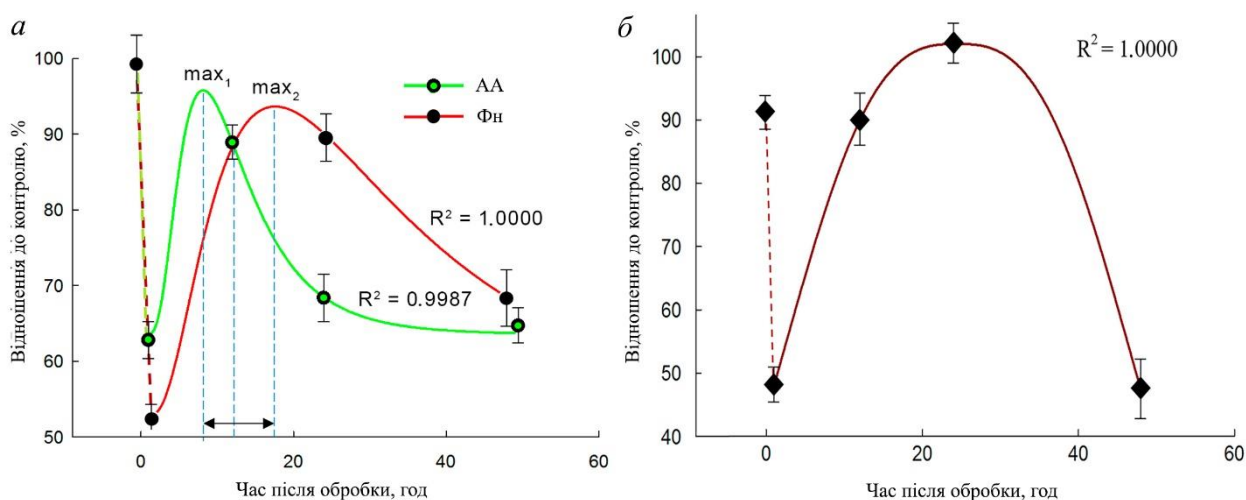


Рис. 5.10. Синхронізований вміст фенольних сполук, антиоксидантів та катехінів в листках суниці садової після обробки високомолекулярним хітозаном: Ph – вміст фенольних сполук (співвідношення до початкового показника, %); АО – антиоксидантна активність (співвідношення до початкового показника, %)

У наших дослідженнях листки рослин не піддавалися механічним пошкодженням тобто не відбувалося порушення цілісності мембран вакуолей і індукованої трансформації фенольних сполук (кон'югатів хлорогенової і оксикоричних кислот, флавоноїдів, катехінів і танінів) до внутрішньоклітинного простору. Враховуючи умови експерименту, полімеризація катехінів (флаван-3-олів) з утворенням конденсованих танінів (проантоціанідинів) відбувалася, головним чином, всередині вакуолей і в інших компартментах.

Динаміка вмісту катехінів у перші 24 год після обробки високомолекулярним хітозаном повністю відповідала показникам загального вмісту фенолів. У першу годину після обробки листків вміст катехінів і проантоціанідинів зменшився по відношенню до контролю майже в 2 рази. У наступні 12 год їх вміст майже повністю відновлювався, тоді як за 24 год

відбувалося зростання по відношенню до контролю. Досягнувши піку даний показник знову зменшувався. Так, відповідна реакція рослинного організму включала кілька послідовних етапів, а саме лінійне зниження концентрації катехінів і потім логнормальна динаміка збільшення з повторним зниженням показника.

Кінетика виявлення захисних механізмів рослини є важливим показником його схильності до уражень патогенами. Швидкість відповідної реакції визначає стратегію виживання рослинного організму. У більшості випадків захисні механізми не обмежуються первинними реакціями. Вони пов'язані з широким спектром біохімічних і структурних перетворень клітин. Найбільш швидкою реакцією на стресовий фактор або дію елісатора є окиснення фенолів і синтез фітоалексинів. Рослинні таніни окиснюються поліфенолоксидазами та пероксидазами при кислому і нейтральному значеннях рН. Salminen et al. [277] зазначають, що структурні ознаки танінів відіграють важливу роль в окисненні поліфенолоксидазами, оскільки різні групи здатні окиснюватися за різних значень рН.

Окиснювальні процеси передують утворенню протеїназ, гідролаз і проліннасичених білків. Структурні зміни в клітинній стінці, пов'язані з відкладеннями каллози на поверхнях клітинних стінок, спостерігаються вже в перші години після зовнішнього впливу. Процеси лігніфікації відбуваються протягом 12-24 години після обробки рослин елісатором. У першу годину після обробки суниці садової розчином хітозану спостерігалась фізіологічна відповідь рослини, що є типовим проявом індукованого імунітету.

Різке зниження вмісту фенолів в екстрактах у відповідь на обробку листків препаратом ВМХ може бути викликано зниженням їх відновлювальної здатності в реакції з реактивом Фоліна - Чекольте внаслідок інтенсивного окислення. Крім того, для рослин відомо глибоке катаболічне перетворення фенольних сполук з утворенням продуктів первинного метаболізму [259].

При окисненні фенолів до хінонів збільшується їхня здатність зв'язуватися з білками потенційних патогенів і попереджати негативний вплив.

Ефект дії на рослини низкомолекулярного хітозану в першу годину після обробки складніший для пояснення. Активація синтезу сполук фенілпропаноїдного шляху і накопичення танінів метаболічно більш тривалий процес. Суттєве збільшення концентрації загальних фенолів і антиоксидантного потенціалу, як швидка реакція рослини на препарат НМХ, може бути обумовлена деполімеризацією танінів.

Цей захисний механізм був описаний Moilanen [239], проте це явище ще не отримало достатньої уваги науковців. Гідроліз танінів призводить до утворення невеликої кількості фенольних сполук (таких, як галова і елагова кислоти). Вони можуть діяти зовсім інакше, ніж їх прекурсори – таніни. У нашому експерименті, специфічність відповідних реакції рослин на препарати хітозану з різною молекулярною масою більш виражена в перші 12 год після обробки. У наступні 36 год різниця в динаміці вмісту фенолів в клітинах суниці нівелюється.

Таким чином, виявлені відмінності в первинних відповідних реакціях рослин на хітозан, які залежать від походження хітозану, його молекулярної маси і ступеню деацетилювання. Низкомолекулярний хітозан швидко долає тканинні і клітинні бар'єри. Він 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 низкомолекулярного хітозану грибного походження може розглядатися, як загальна мобілізація рослинного організму проти потенційного патогена. Сила і швидкість реакції у відповідь передбачає наявність у рослин даного сорту відповідної системи сприйняття молекулярного тригера (елісатора) і запуску відповідних фізіологічних реакцій.

Принципова відмінність в реакції рослин, отриманих методом клонування, на високомолекулярний хітозан тваринного походження свідчить про зовсім іншу систему сприйняття сигналу. Стрімке зниження вмісту фенолів може бути пов'язано зі стратегій ізоляції тканин від потенційної

загрози, який спрямований на нейтралізацію потенційної загрози. Результатом такої реакції є окислення фенолів, додаткова лігніфікація і суберинізація клітинних стінок. З огляду на те, що індукований імунітет у рослин не є специфічним, подібні трансформації на клітинному рівні ефективні в разі появи перших симптомів хвороби, до яких є сприйнятливість. Неспецифічна активація сигнальних систем і окислювальний вибух здатні обмежити поширення інфекції і в подальшому мобілізувати інші захисні механізми рослини.

5.3. Дослідження впливу хітозану на морфо-фізіологічні показники рослин-регенерантів і синтез фенолкарбонових кислот у листках *Nicotiana tabacum* L.

Рослини-регенеранти *N. tabacum* які отримано методом мікроклонування *in vitro*, на дію високомолекулярного хітозану реагували зниженням вмісту в листках фенольних сполук, що пов'язано з утворенням специфічних біополімерів, які забезпечують ізоляцію тканин з нейтралізацією потенційної загрози. Результатом захисної реакції є окиснення фенолів, додаткова лігніфікація і суберинізація клітинних стінок. З огляду на те, що індукований імунітет у рослин не є специфічним, подібні трансформації на клітинному рівні ефективні у разі появи перших симптомів бактеріозів. Неспецифічна активація сигнальних систем і окиснювальний вибух можуть обмежити поширення інфекції і в подальшому мобілізувати інші захисні механізми рослини.

Так рослини-регенеранти після інокуляції досить агресивного по відношенню до представників родини Solanaceae штаму *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 вже за 48 год виявили некротичні ураження безпосередньо у зонах впливу фітопатогенних бактерій (рис. 5.11.).

Рослини-регенеранти *N. tabacum* за показником зменшення площі ураження листків після способів обробки розташувались наступним чином:

контроль > хітозан I > хітозан II > хітозан III

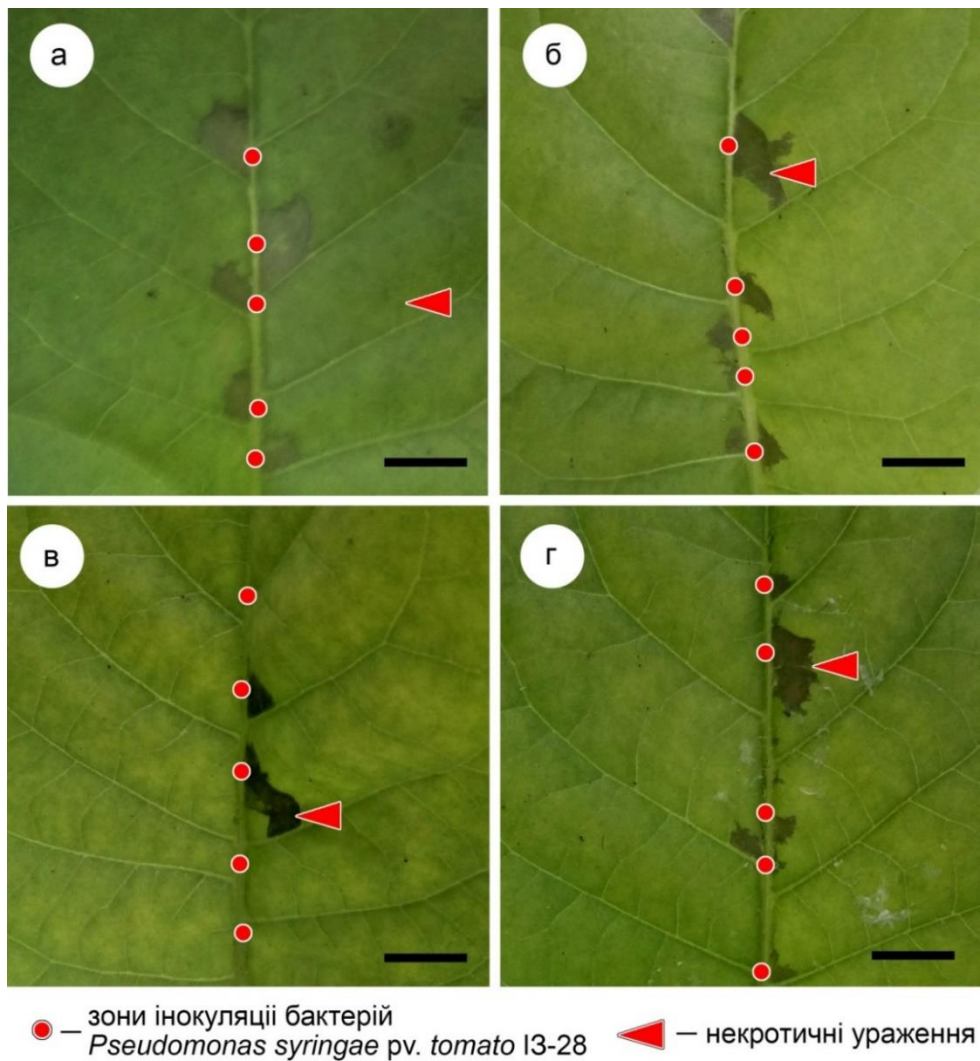


Рис. 5.11. Вплив хітозану на розвиток симптомів бактеріозу за 72 год після штучної інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* І3-28: а – контрольні рослини; після предобробки листків хітозаном І (б), хітозаном ІІ (в), хітозаном ІІІ (г)

Слід зазначити, що окрім площі ураження вирізнявся також і рисунок некротичних плям на поверхні листків. Так, за умов обробки рослин хітозаном ІІ плями мали рівний достатньо темний контур, який обмежувався жилками третього порядку (рис. 5.11, в). Інтенсивність потемніння асиміляційних тканин напряму пов'язана з глибиною некротичних перетворень. Схожі ознаки, патогенезу спостерігались і на листках після обробки хітозаном І. Форма і чіткість контуру некротизованих тканин і їхня просторова залежність від розташування провідних пучків свідчить про активність окиснювальних процесів з якими пов'язані реакції надчутливості рослин. Певною мірою вони

реалізуються за участю фенольних сполук. За співставленням динаміки концентрації фенольних сполук у неінокульованих і інокульованих листках з'ясовано ефективна дія хітозанів (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Динаміка вмісту фенольних сполук у листках *N. tabacum* після інокуляції культури *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 за умов обробки високо- і низькомолекулярним хітозаном

Загальний пул фенольних сполук мг/г								
Час, год	Контроль		Хітозан І		Хітозан ІІ		Хітозан ІІІ	
	НІН	ІНК	НІН	ІНК	НІН	ІНК	НІН	ІНК
6	46,09	45,23	48,62	35,14	65,28	35,45	51,52	43,06
18	53,22	46,10	48,86	34,92	63,40	37,10	70,45	49,37
48	57,08	60,66	38,81	43,47	75,80	41,33	78,99	38,95
72	56,29	66,59	55,95	44,65	71,82	46,18	67,10	40,66
Флавоноїди, мг/г								
6	5,40	6,22	4,30	3,46	7,72	3,47	4,69	2,36
18	7,28	6,18	3,49	2,89	6,81	2,34	5,58	3,34
48	6,21	6,67	3,60	2,76	6,14	3,96	6,88	4,18
72	5,37	8,26	4,99	4,79	8,76	4,02	7,59	3,80
Загальні феноли/флавоноїди								
6	8,5	7,3	11,3	10,2	8,5	10,2	11,0	18,2
18	7,3	7,5	14,0	12,1	9,3	15,9	12,6	14,8
48	9,2	9,1	10,8	15,8	12,3	10,4	11,5	9,3
72	10,5	8,1	11,2	9,3	8,2	11,5	8,8	10,7

НІН – неінфікований листок, ІНК - листок після інокуляції культури бактерій, Хітозан І - from shrimp shells low-viscosity (Sigma-Aldrich), Хітозан ІІ - molecular weight: 100,0-300,0 (Acros Organics), Хітозан ІІІ - high molecular weight (Sigma-Aldrich)

У контрольної групи рослин різниця між інокульованими і не інокульованими листками була незначною. Достовірна різниця ($p > 0,05$) визначалась лише за 18 і 72 год. Підвищення концентрації фенолів з часом була чітко виражена 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 оброблялись хітозаном I ($r = 0,953$; $p > 0,047$), хітозаном II ($r = 0,996$; $p > 0,004$). За умов обробки рослин хітозаном III ця залежність нівелювалася. За кількісними показниками найбільшу стимуляцію синтезу фенольних сполук викликав у рослин хітозан II з молекулярною масою 100-300 кДа, що пояснює його високу ефективність у розвитку захисних реакцій рослин після попередньої обробки.

За показником вмісту флавоноїдів відповідні реакції в цілому мають схожу тенденцію. Водночас за обробки рослин Хітозаном III у листках спостерігалось лінійне підвищення вмісту флавоноїдів, тоді як в контролі відбувалось підвищення їхнього вмісту, а після обробки хітозаном I й II у перші 18 год зменшувались. Крім того на хроматографах нами було виявлено нові фенольні продукти з ($R_f \sim 0,27$), які виникали в інокульованих бактеріями листках після обробки хітозаном II вже на 6 год і зберігалось протягом 72 год. Даний продукт виявлено також і після обробки листків хітозаном III, втім лише протягом 18 год.

Продукти з яскраво блакитною флуоресценцією ($R_f \sim 0,37$) з'являлись у бактеріозних листках після хітозаном I (рис. 5.12., показано стрілками), що свідчить про те, що відповідні фізіологічні реакції, синтез і трансформація вторинних метаболітів рослин залежать від фізико-хімічних характеристик хітозану. Вміст рутину, як одного з основних флавоноїдів у не інокульованих і інокульованих листках *N. tabacum* вирізнявся (рис. 5.13–5.16). Обробка листків водою і низькомолекулярним хітозаном за умов їх ураження *P. syringae* вміст рутину збільшувався.

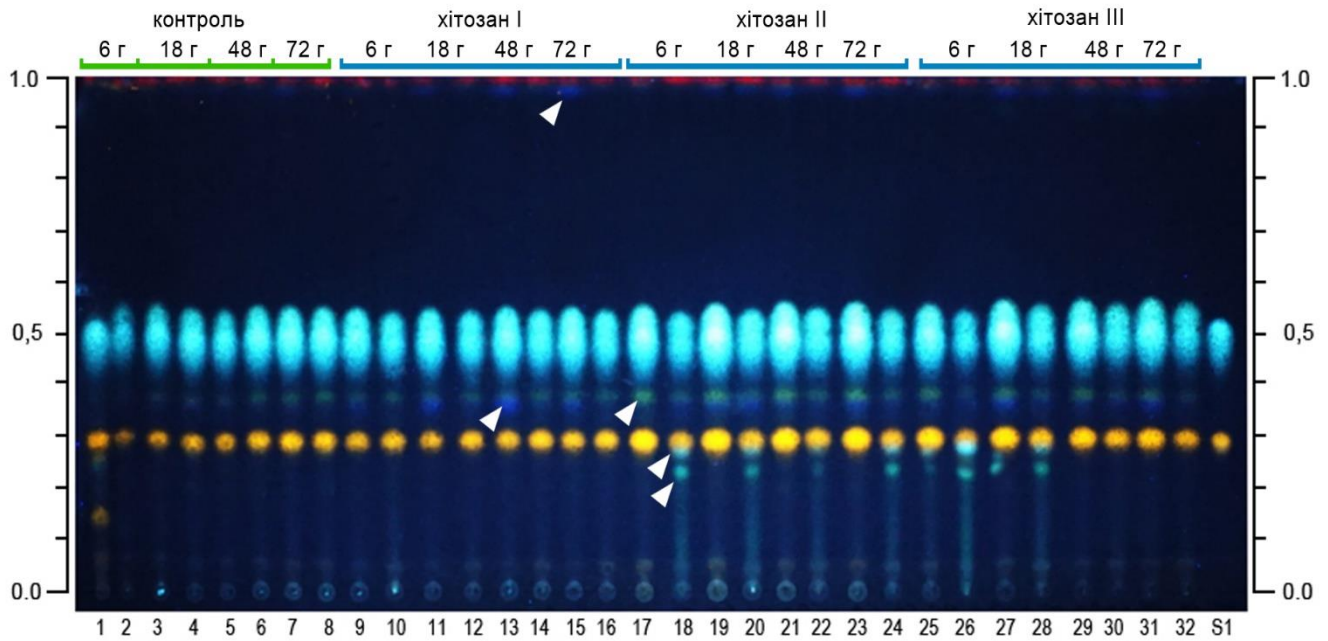


Рис.5.12. Хроматограма екстрактів листків *N. tabacum*: контроль (1,3,5,7 – неінфікованих, 2,4,6,8 – інфікованих PS.), після обробки хітозаном I (9,11,13,15 – неінфікованих, 10,12,14,16 – інфікованих PS.), хітозаном II (17,19,21,23 – неінфікованих, 18,20,22,24 – інфікованих PS.), хітозаном III (25,27,29,31 – неінфікованих, 26,28,30,32 – інфікованих PS.), St – рутин, хлорогенова кислота

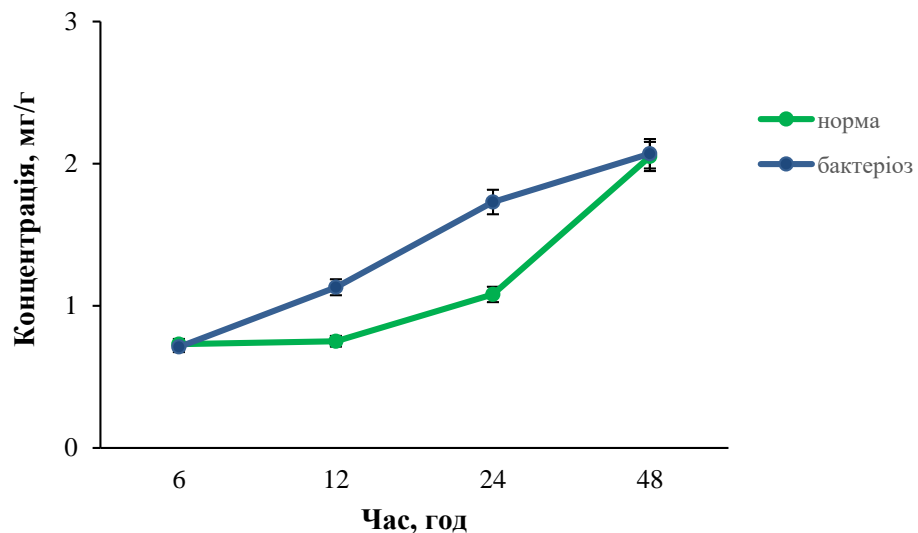


Рис. 5.13. Динаміка вміст рутину у листках *N. tabacum* після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* IZ-28 без попередньої обробки

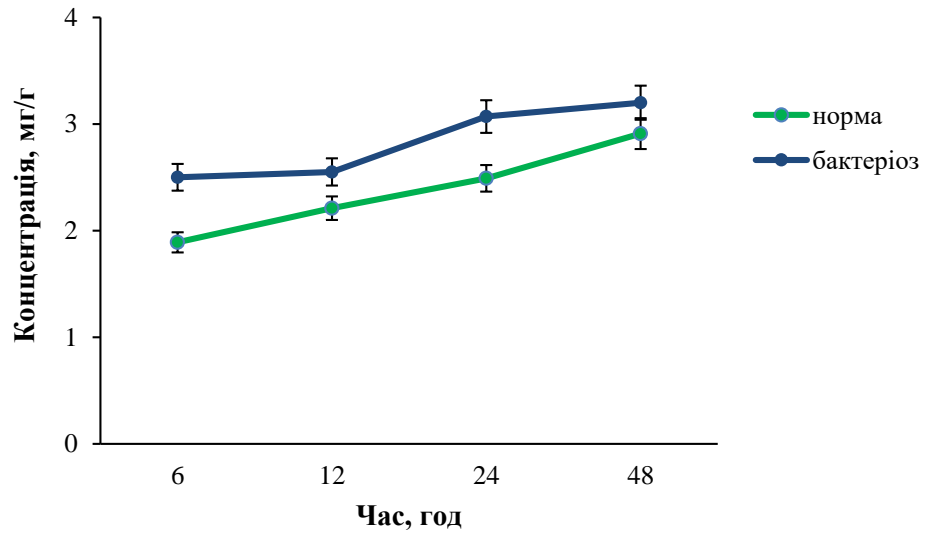


Рис. 5.14. Динаміка вміст рутину в листках *N. tabacum* після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 за умов обробки хітозаном І

Після обробки рослин високомолекулярним хітозаном вміст рутину зменшувався, що вірогідно пов'язано з його розкладанням.

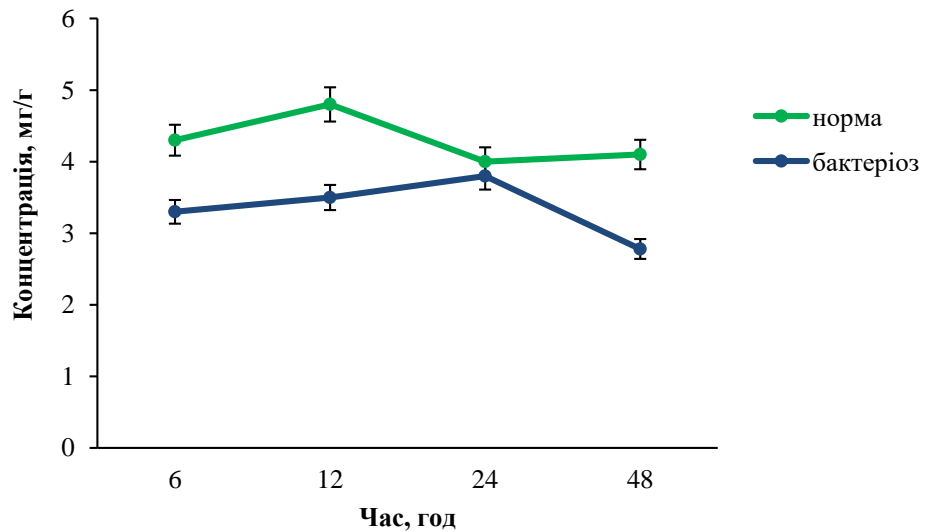


Рис. 5.15. Динаміка вміст рутину в листках *N. tabacum* після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 за умов обробки хітозаном ІІ

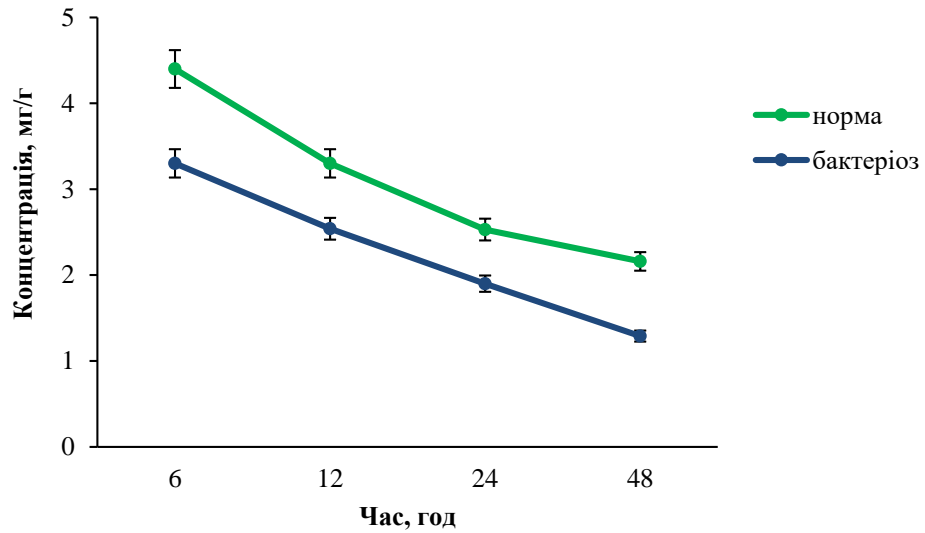


Рис. 5.16. Динаміка вміст рутину в листках *N. tabacum* після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 за умов обробки хітозаном ІІІ

Динаміка вмісту іншого важливого продукту в антиоксидантній системі рослини – хлорогенової кислоти (ХГК), за умови обробки листків хітозанами вирізнялась її зменшенням в уражених листках (5.17.-5.20.).

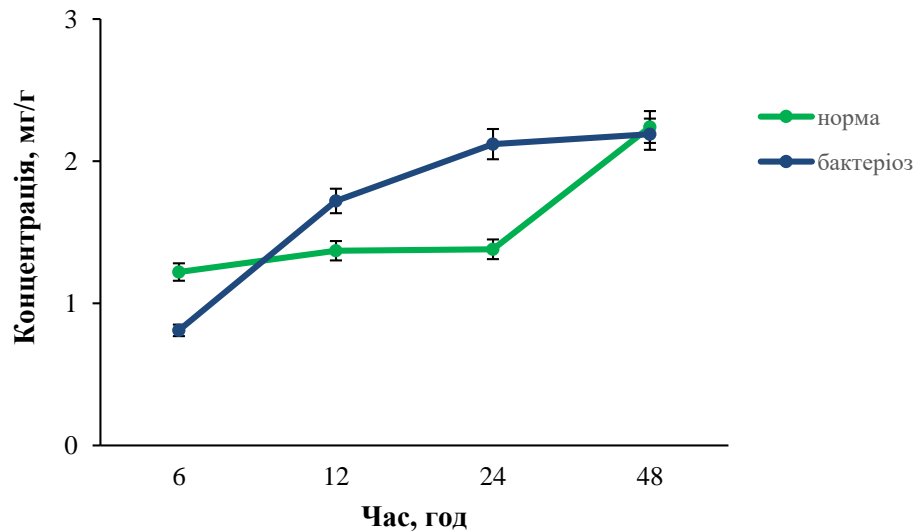


Рис. 5.17. Динаміка вміст хлорогенової кислоти в листках *N. tabacum* після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28

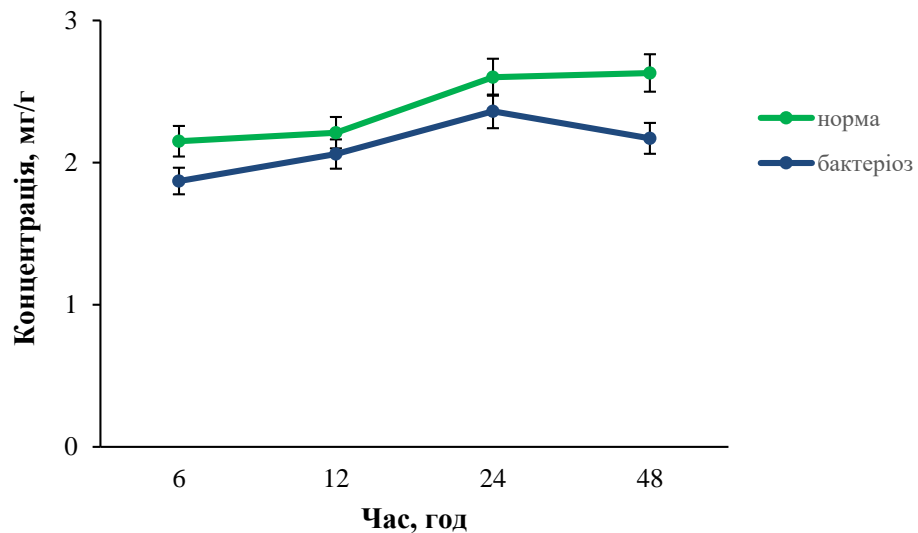


Рис. 5.18. Динаміка вміст хлорогенової кислоти в листках *N. tabacum* після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 за умов обробки хітозаном І

За умов обробки листків низькомолекулярним хітозаном (І) протягом всього експерименту відбувалось поступове збільшення ХГК (рис. 5.18). Дія хітозану ІІ визначалась тим, що після підвищення вмісту ХГК на 18 год він поступово зменшувався і за умов бактеріозу активніше (рис. 5.19).

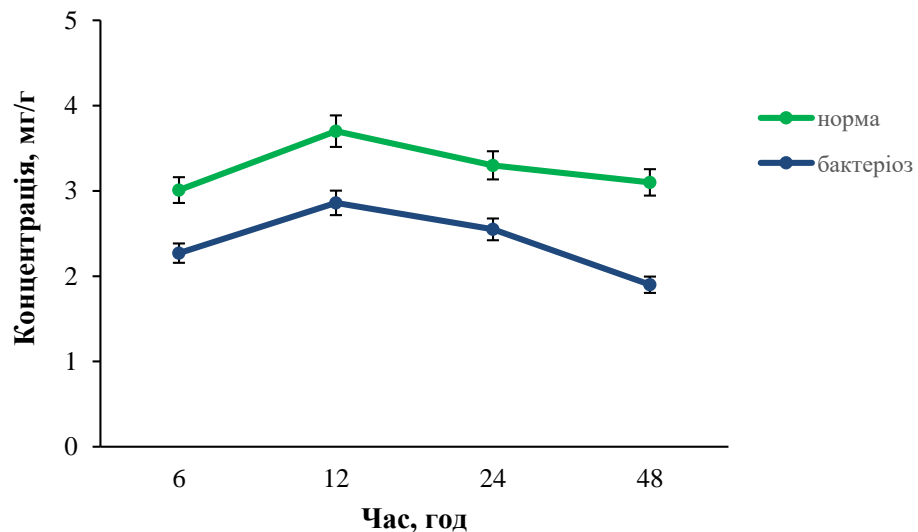


Рис. 5.19. Динаміка вміст хлорогенової кислоти в листках *N. tabacum* після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 за умов обробки хітозаном ІІ

Аналогічний процес спостерігався у рослин після обробки рослин хітозаном III (рис. 5.20).

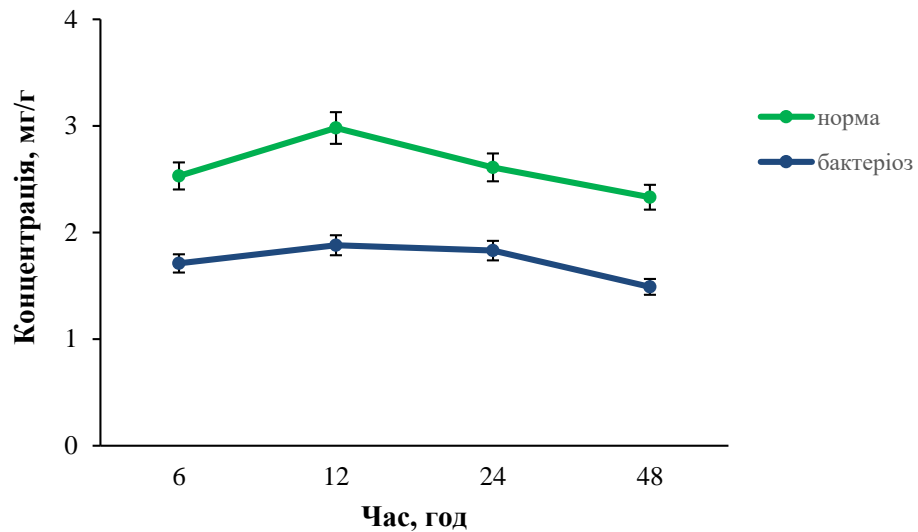


Рис. 5.20. Динаміка вміст хлорогенової кислоти в листках *N. tabacum* L. після інокуляції *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 за умов обробки хітозаном III

Отже, окремі ланки фенольного синтезу виявляють високу чутливість до хітозанів, а відповідна реакція рослини залежить від їхньої молекулярної маси.

Висновки до 5 розділу:

1. Встановлено відмінності відповідних реакцій рослин суниці садової на обробку НМХ та ВМХ. 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 НМХ, розчин ВМ полімеру викликав у листках різке зниження вмісту вільних і слабкозв'язаних з клітинними стінками фенольних сполук.

2. Встановлено динаміку накопичення фенольних сполук під дією хітозанів рослинного і тваринного походження.

3. Показано особливості накопичення елаговой кислоти, як одного із основних прекурсорів синтезу захисних фенольних сполук, зокрема гідролізованих танінів. Так, під дією розчинів НМХ та ВМХ відбувалося

стрімке накопичення елагової кислоти в першу годину після обробки з подальшою нормалізацією фоновому рівня. Це свідчить про реактивність відповідних реакцій, як однією із стратегій захисту рослин.

4. Виявлено добові коливання показників вмісту фенольних сполук, зокрема елаготанінів і флавоноїдів у листках модельних культур. Найбільш вираженим було збільшення вмісту в листках ГГДФ-глюкози, галоїлхіної кислоти, пентозиду елагової кислоти, глікозиду кемпферола та елагової кислоти в ранкові години з подальшим зниженням у вечірній і нічний час доби. Сполуки цього класу підвищують стійкість рослин проти фітопагенів. Виявлена закономірність збігається з реакцією рослин на хітозан, що свідчить про універсальність захисних реакцій незалежно від природи їхньої індукції.

Матеріали розділу опубліковано у працях [42, 294, 295, 296]

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 розчинами хітозанів загалом виявлено 13 видів грибів із 11 родів відділу Ascomycota (табл. 6.1).

Серед них було ідентифіковано фузаріуми – збудники в'янення та кореневих гнилей суниці садової [174]. Найчастіше на листках суниці садової зустрічались 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 (НМХ) та високомолекулярним (ВМХ) хітозанами – *Alternaria tenuissima* (44,4 і 37,5 %), *Fusarium* sp. і *Penicillium* sp. (37,5 %) (табл. 6.1). Мікроміцети *Aspergillus nidulans* та *Nigrospora oryzae* виділялись із листків суниці садової в контрольній групі, вид *Trichoderma viride* ізолювався після застосування НМХ через 48 год.

Таблиця 6.1.

Видовий склад, рівень заселення (%) і частота трапляння (%) мікроміцетів філоплани *F. ananassa* після обробки низькомолекулярним (НМХ) та високомолекулярним (ВМХ) хітозанами

№ п/п	Види мікроміцетів	Варіант досліджу													Частота трапляння, %
		Контроль	Вода				НМХ				ВМХ				
			1	12	24	48	1	12	24	48	1	12	24	48	
			год.	год.	год.	год.	год.	год.	год.	год.	год.	год.	год.	год.	
Рівень заселення, %															
1	<i>Alternaria tenuissima</i> (Nees) Wiltshire	12,0	12,5	-	25,0	12,5	44,4	12,5	25,0	12,5	25,0	12,5	37,5	25,0	92,3
2	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	4,0	-	12,5	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-	-	23,0
3	<i>A. nidulans</i> (Eidam) G. Winter	12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7
4	<i>A. wentii</i> Wehmer	4,0	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	15,4
5	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.	4,0	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	15,4
6	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	16,0	12,5	-	-	-	-	-	12,5	25,0	-	-	-	-	30,8
7	<i>Fusarium</i> sp.	4,0	12,5	12,5	-	12,5	-	12,5	37,5	-	25,0	12,5	25,0	25,0	69,2
8	<i>Gliocladium roseum</i> Bainier	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	15,4
9	<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen	4,0	12,5	-	-	50,0	11,1	-	-	25,0	-	-	-	12,5	46,2
10	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7
11	<i>Penicillium</i> sp.	8,0	25,0	-	12,5	-	22,2	25,0	-	12,5	25,0	12,5	37,5	37,5	76,9
12	<i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerbell	4,0	-	-	-	-	-	-	12,5	-	12,5	-	-	-	23,0
13	<i>Trichoderma viride</i> Pers.	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	7,7
	Всього видів	11	6	2	2	3	4	4	4	6	4	4	3	4	

Примітка: «-» – вид не було виділено.

Відомо, що спори та конідії грибів є більш чутливими до впливу хітозану та його похідних [184, 187, 329]. Гриби родів *Aspergillus* Micheli та *Penicillium* Link належать до епіфітних видів, що інтенсивно утворюють конідії на поверхні листків суниці садової. Серед них аспергіли виявились більш чутливими до розчинів хітозану, ніж пеніцилії, про що свідчать невисокі показники частоти трапляння (7,7-23,0 %) та рівня заселення листків (4,0-12,5 %) після обробки.

Найбільше видове різноманіття епіфітних мікроміцетів (11 видів) спостерігалось на листках в контролі, а також по 6 видів грибів ізольовано через 1 год після обробки водою та через 48 год після обробки низькомолекулярним хітозаном. Найменше грибів виділяли із листків суниці садової оброблених водою після експозиції 12-48 год, де їхня кількість становила 2-3 види. Однак, мікобіоти у цих варіантах досліду виявились повністю відмінними, про що свідчить коефіцієнт спільності Стугрена-Радулеску $\rho=1,0$ (табл. 6.2). Подібними між собою виявились комплекси грибів ізольованих із листків досліджених рослин після обробки водою та високомолекулярним хітозаном через 48 год. ($\rho=0,40$) та мікобіоти після застосування НМХ (експозиція 12 год) та ВМХ через 24 год. Не спостерігалось відмінності у видовому складі мікроміцетів виділених із поверхні листків суниці оброблених високомолекулярним хітозаном за різної експозиції ($\rho=0,40$).

У результаті досліджень ризоплани суниці садової після застосування води та хітозанів ізольовано та ідентифіковано 8 видів грибів, серед яких виявлено збудників хвороб кореневої системи: *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma herbarum* і *Rhizoctonia* sp. (табл. 6.3.) [171]. При цьому високу частоту трапляння демонстрували види *C. destructans* 85,7 % та *Penicillium* sp. 57,1%.

Таблиця 6.2.

Рівень подібності видового складу мікроміцетів філоплани *F. ananassa* Duch. після обробки низькомолекулярним (НМХ) та високомолекулярним (ВМХ) хітозанами (Коефіцієнт дискримінації Стугрена-Радулеску (ρ))

Варіант дослідження		Варіант дослідження												
		Контроль	Вода				НМХ				ВМХ			
			1 год	12 год	24 год	48 год	1 год	12 год	24 год	48 год	1 год	12 год	24 год	48 год
	контроль	-	0,55	0,73	0,73	0,73	0,58	0,58	0,58	0,55	0,58	0,67	0,73	0,58
Контроль	1 год.	0,55	-	0,78	0,60	0,50	0,54	0,54	0,54	0,50	0,54	0,43	0,50	0,43
	12 год.	0,73	0,78	-	1,0	0,67	0,50	0,50	0,71	1,0	0,71	0,71	0,67	0,71
	24 год.	0,73	0,60	1,0	-	0,67	0,50	0,50	0,71	0,60	0,50	0,50	0,43	0,50
	48 год.	0,73	0,50	0,67	0,67	-	0,56	0,56	0,56	0,64	0,56	0,56	0,50	0,40
НМХ	1 год.	0,58	0,54	0,50	0,50	0,56	-	0,60	0,78	0,54	0,60	0,60	0,56	0,45
	12 год.	0,58	0,54	0,50	0,50	0,56	0,60	-	0,60	0,67	0,45	0,45	0,40	0,45
	24 год.	0,58	0,54	0,71	0,71	0,56	0,78	0,60	-	0,67	0,45	0,60	0,56	0,60
	48 год.	0,55	0,50	1,0	0,60	0,64	0,54	0,67	0,67	-	0,67	0,67	0,64	0,54
ВМХ	1 год.	0,58	0,54	0,71	0,50	0,56	0,60	0,45	0,45	0,67	-	0,45	0,40	0,45
	12 год.	0,67	0,43	0,71	0,50	0,56	0,60	0,45	0,60	0,67	0,45	-	0,40	0,45
	24 год.	0,73	0,50	0,67	0,43	0,50	0,56	0,40	0,56	0,64	0,40	0,40	-	0,40
	48 год.	0,58	0,43	0,71	0,50	0,40	0,45	0,45	0,60	0,54	0,45	0,45	0,40	-

Найвищий рівень заселення коренів суниці садової муковорим грибом *Mortierella isabellina* становив 50,0% і відмічено через 48 год. після обробки водою. Це можна пояснити тим, що муковорі гриби, до яких відноситься даний вид, надають перевагу субстратам із підвищеною вологою. Однак, *M. isabellina* не виділялась у ризоплані суниці садової обробленої низькомолекулярним та високомолекулярним хітозанами, що узгоджується із даними інших дослідників про те, що муковорі гриби є чутливими до впливу хітозанів із різною молекулярною масою [187, 260].

Високим рівнем заселення характеризувались види *S. destructans* і *F. oxysporum* (37,5 %) через 12 і 48 год відповідно після обробки НМХ. Слід зазначити, що фузаріум ізолювався через 48 год. після застосування на суниці обох розчинів. Виявлено, що збудник чорної гнилі коренів та ягід – ризоктонія, а також відомий мікроміцет-антагоніст *Trichoderma viride*, не виділялись із ризоплани після обробки розчинами хітозанів. Вид *Phoma herbarum*, який за літературними даними асоціюється із кореневою системою суниці садової, було ізольовано за обробки НМХ [171].

Найбільша кількість видів 5 виділена із коренів оброблених низькомолекулярним хітозаном через 48 год. Жодного виду мікроміцетів не виявлено у ризоплані після застосування високомолекулярним хітозаном через 12 год., що пояснює повну відмінність із видовим складом грибів ідентифікованих в контролі, через 12 год. за обробки водою та НМХ ($p=1,0$) (табл. 6.4). Найбільш подібними виявились комплекси грибів ізольовані із коренів після обробки НМХ та ВМХ через 48 год. – $p=0,45$.

Таблиця 6.3.

Видовий склад та чисельність мікроміцетів ризоплани *F. ananassa* після обробки низькомолекулярним (НМХ) та високомолекулярним (ВМХ) хітозанами

№ п/п	Види мікроміцетів	Варіант дослід							Частота трапляння, %
		контроль	вода		НМХ		ВМХ		
		0 год.	12 год.	48 год.	12 год.	48 год.	12 год.	48 год.	
		Коефіцієнт заселення, %							
1	<i>Alternaria tenuissima</i> (Nees) Wiltshire	-	-	-	25,0	12,5	-	-	28,6
2	<i>Cylindrocarpon destructans</i> (Zinssm.) Scholten	12,5	25,0	12,5	37,5	25,0	-	12,5	85,7
3	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	-	-	-	-	37,5	-	12,5	28,6
4	<i>Mortierella isabellina</i> Oudem.	-	-	50,0	-	-	-	-	14,3
5	<i>Penicillium</i> sp.	25,0	-	25,0	-	12,5	-	25,0	57,1
6	<i>Phoma herbarum</i> Westend.	-	-	-	-	12,5	-	-	14,3
7	<i>Rhizoctonia</i> sp.	12,5	12,5	-	-	-	-	-	28,6
8	<i>Trichoderma viride</i> Pers.	-	12,5	-	-	-	-	-	14,3
	Всього видів	3	3	3	2	5	0	3	

Примітка: «-» – вид не було виділено.

Таблиця 6.4.

Рівень подібності видового складу мікроміцетів ризоплани *F. ananassa* після обробки низькомолекулярним (НМХ) та високомолекулярним (ВМХ) хітозанами (Коефіцієнт дискримінації Стугрена-Радулеску (ρ))

Варіант досліджу		Варіант досліджу						
		контроль	вода		НМХ		ВМХ	
		0 год	12 год	48 год	12 год	48 год	12 год	48 год
контроль	0 год	-	0,50	0,50	1,0	0,60	1,0	0,50
	12 год	0,50	-	0,71	0,67	0,78	1,0	0,71
вода	48 год	0,50	0,71	-	0,78	0,60	0,71	0,50
	12 год	1,0	0,67	0,78	-	0,56	1,0	0,67
НМХ	48 год	0,60	0,78	0,60	0,56	-	0,67	0,45
	12 год	1,0	1,0	0,71	1,0	0,67	-	1,0
ВМХ	48 год	0,50	0,71	0,50	0,67	0,45	1,0	-

Із ґрунту до та після обробки розчинами хітозанів ізолювано 13 видів міксоміцетів, що належать до 10 родів (табл. 5.8). Найбільш представленим виявився рід *Penicillium* Link (4 види). Серед виділених видів грибів ідентифіковано потенційні збудники корневих гнилей і в'янення суниці садової – *Fusarium* sp., сумчасту стадію антракнозу – *Glomerella cingulata* [224, 247].

Найчастіше траплялись *Fusarium* sp. і *Penicillium* sp. – 85,7 %, а також *Penicillium frequentans* (71,4 %), *Cladosporium herbarum* та *Trichoderma viride* (57,1 %) (табл. 6.5).

Таблиця 6.5.

Видовий склад, чисельність (тис. КУО/1 г) та частота трапляння (%) мікроміцетів у ґрунті після обробки
низькомолекулярним (НМХ) та високомолекулярним (ВМХ) хітозанами

№ п/п	Види мікроміцетів	Варіант досліджу							Частота трапляння, %
		контроль	вода		НМХ		ВМХ		
		0 год.	12 год.	48 год.	12 год.	48 год.	12 год.	48 год.	
		Чисельність тис. КУО мікроміцетів в 1 г ґрунту							
1	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	-	-	-	-	-	-	0,2±0,04	14,3
2	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	-	-	1,5±0,4	-	3,1±0,8	0,2±0,04	3,4±0,8	57,1
3	<i>Fusarium</i> sp.	-	0,2±0,04	4,5±1,1	1,6±0,4	7,7±1,9	0,2±0,04	5,1±1,3	85,7
4	<i>Gliocladium roseum</i> Bainier	-	-	-	-	-	1,7±0,4	-	14,3
5	<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	-	-	-	0,2±0,04	-	-	-	14,3
6	<i>Mortierella isabellina</i> Oudem.	2,7±0,7	-	-	-	-	-	-	14,3
7	<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	-	4,8±1,2	-	-	3,1±0,8	-	-	28,6
8	<i>P. frequentans</i> Westling	7,9±2,0	-	1,5±0,4	1,63±0,4	1,5±0,3	-	5,1±1,3	71,4
9	<i>P. variable</i> Sopp	-	3,2±0,8	0,5±0,1	-	-	-	0,7±0,2	42,9
10	<i>Penicillium</i> sp.	47,4±11,9	20,7±5,2	22,7±5,7	4,9±1,2	6,3±1,6	-	18,7±4,7	85,7
11	<i>Phoma herbarum</i> Westend.	-	-	-	-	-	10,1±2,5	-	14,3
12	<i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerbell	-	3,2±0,8	-	-	-	-	-	14,3
13	<i>Trichoderma viride</i> Pers.	0,3±0,08	1,6±0,4	-	-	1,6±0,3	1,7±0,4	-	57,1
	Всього видів	4	6	5	4	6	5	6	

Примітка: «-» – вид не було виділено.

Тільки в ґрунті контролю зустрічався вид *Mortierella isabellina*, в обробленому водою – *Sarocladium kiliense*, із низькомолекулярним хітозаном – *Glomerella cingulata*, із високомолекулярним хітозаном – *Aspergillus niger*, *Gliocladium roseum* і *Phoma herbarum*.

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 (табл. 6.5). 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 ізолювався через 12 год. після обробки високомолекулярним хітозаном, але через 48 год. його кількість становила 18,7 тис. КУО/г ґрунту. Загалом для пенициліїв була характерною тенденція до зменшення чисельності у ґрунті після обробки різними формами хітозанів (табл. 6.5; рис. 6.1).

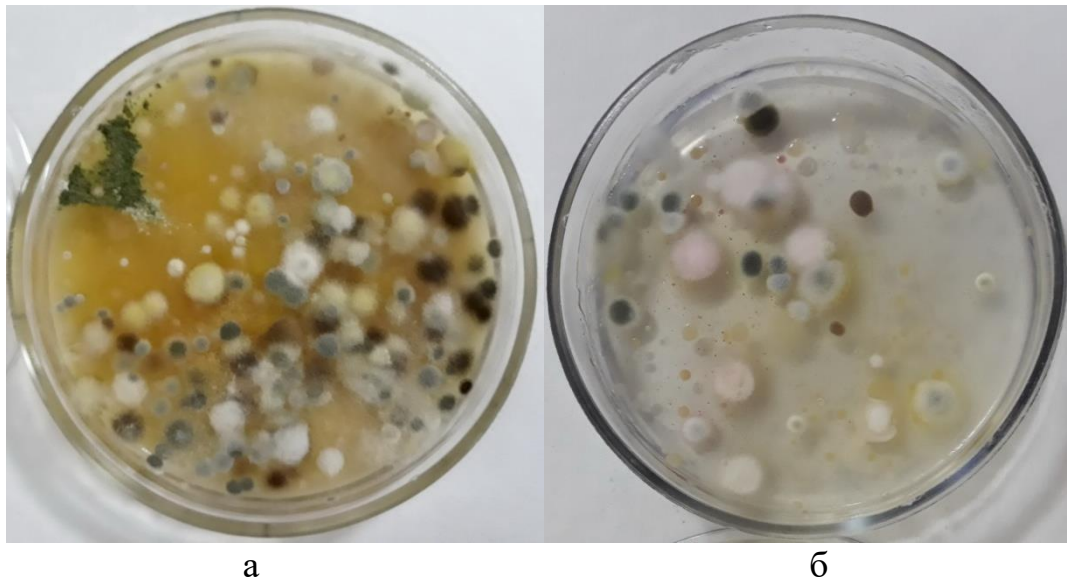


Рис. 6.1. Зміна чисельності пенициліїв у ґрунті: а – ґрунт контролю; б – ґрунт через 48 год після обробки НМХ (середовище Чапека, 7-ма доба росту).

Для фузаріумів, навпаки, спостерігалось збільшення чисельності з експозицією обробки як водою, так і розчинами хітозанів. Це можна пояснити тим, що гриби роду *Fusarium* у ґрунті знаходяться переважно у вигляді гіф

міцелію, які, за даними літератури, є більш стійким до впливу хітозанів із різною молекулярною масою [188].

Нами ізольовано 6 видів мікроміцетів із зразків ґрунту обробленого водою через 12 год. та розчинами хітозанів через 48 год. Найменшу кількість видів 4 виділено із ґрунту контролю та із НМХ через 12 год.

Найменшою спільністю ($K_j=12,5\%$) характеризувались мікобіоти ґрунту контролю та через 12 год. після обробки високомолекулярним хітозаном, а також комплекси мікроміцетів ізольовані із ґрунту після обробки хітозанами через 12 год. (табл. 6.6). Найбільша спільність виділених видів виявлена у складі грибів, виділених із ґрунту обробленого водою та ВМ хітозаном через 48 год. ($K_j=83,3\%$).

Таблиця 6.6.

Спільність видового складу мікроміцетів, ізольованих із ґрунту, після обробки низькомолекулярним (НМХ) та високомолекулярним (ВМХ) хітозанами за Жаккаром, %

Варіант досліджу		Варіант досліджу						
		контроль	вода		НМХ		ВМХ	
		0 год.	12 год.	48 год.	12 год.	48 год.	12 год.	48 год.
контроль	0 год.	-	25,5	28,6	33,3	42,8	12,5	25,0
Вода	12 год.	25,0	-	37,5	25,0	50,0	22,2	33,3
	48 год.	28,6	37,5	-	50,0	57,1	25,0	83,3
НМХ	12 год.	33,3	25,0	50,0	-	42,8	12,5	42,8
	48 год.	42,8	50,0	57,1	42,8	-	37,5	50,0
ВМХ	12 год.	12,5	22,2	25,0	12,5	37,5	-	15,4
	48 год.	25,0	33,3	83,3	42,8	50,0	15,4	-

Виявлено, що мікобіота філоплани *F. ananassa* Duch. представлена мікроміцетами, що відносяться до аскоміцетів із *Alternaria* і *Penicillium* як

найбільш частими родами, за якими йдуть види *Fusarium*. Дані мікроскопічні гриби є загальновідомими епіфітами, що існують на поверхні надземних органів багатьох видів рослин [141, 190, 228, 246].

Встановлено, що досліджувані форми хітозану мають стимулюючий ефект на домінуючі роди мікроміцетів філоплани, і як наслідок, зростання їхнього рівня заселення листків суниці після обробки. Це узгоджується із даними, отриманими іншими дослідниками, які вважають, що хітозан виступає у ролі стресу, відповідною реакцією на який є інтенсивний розвиток грибів [105, 111, 184]. Поверхнева обробка рослин розчинами хітозану підвищила рівень заселення філоплани домінуючими видами мікроміцетів, але в той же час неоднаково вплинула на загальне різноманіття мікобіоти. Видова структура грибів-епіфітів суниці садової після застосування НМХ та ВМХ на певних етапах була подібною. Однак, після експозиції 48 год. спостерігалася повна відмінність угруповань мікроміцетів за обробки листків суниці НМХ в порівнянні з водою. І, навпаки, видовий склад мікобіоти після впливу ВМХ виявився подібним до виділеного після обробки водою, що може свідчити про кращу адаптацію грибів до цієї форми хітозану.

Встановлено, що у ризосфері суниці найчастіше трапляються мікроміцети родів *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* Link і *Trichoderma* Pers., а найчисельнішими є пеніцилії, що узгоджується із даними інших вчених [110, 227]. Відомо, що більшість видів мікроскопічних грибів, виділених нами із ризосфери, є сапротрофами [119, 202], окрім фузаріумів, певні штами яких можуть ушкоджувати рослини суниці і спричиняти хвороби кореневої і судинної систем [28, 223, 247].

Визначено, що внесення хітозану не однаково вплинуло на мікобіоту ризосфери суниці садової, яка виявила до нього різну чутливість. Найбільший інгібуючий ефект обох форм хітозану спостерігали на пеніциліях, кількість КУО яких в ґрунті виявилась меншою порівняно із контрольним. Це підтверджує дані інших авторів про високу активність хітозану по відношенню до грибів роду *Penicillium* [184, 211].

Задовільний контролюючий ефект хітозану відмічається для збудників антракнозу – грибів роду *Colletotrichum* Corda [184, 287]. В результаті наших досліджень телеоморфу збудника антракнозу суниці (*G. cingulata*) ізолювали із ґрунту з НМХ під час першого обліку, надалі цей мікроміцет не виявлено в жодному із варіантів досліду.

Відсутність чутливості до хітозану та збільшення чисельності після його внесення продемонстрували фузаріуми, що узгоджується із деякими публікаціями, в яких зазначається, що певні фітопатогени, зокрема гриби роду *Fusarium*, можуть бути толерантними до застосування індукторів стійкості, що призводить до зростання ураження рослин [67, 188, 338].

Встановлено, що антифунгальна активність хітозану залежить від середовища існування грибів, в яке він вноситься. Обробка ґрунту різними формами хітозану спочатку мала більший вплив на видове різноманіття мікобіоти ризосфери суниці, яка характеризувалась найменшою спільністю видів порівняно із контролем. Однак, із збільшенням часу експозиції спостерігали відновлення видового складу мікроміцетів у ризосфері суниці із ВМХ, де структура мікобіоти відзначалась високою спільністю із тією, що виділяли із ґрунту, в який вносили воду.

Мікобіота філоплани, ризоплани і ризосфери суниці садової по різному реагує на розчини хітозану, про що свідчить динаміка їхнього видового складу, зміни рівня заселення та частоти трапляння. Отримані дані демонструють, що окрім фізіологічної активності та функціональних властивостей, які залежать від молекулярної маси, не менш важливим для ефективності хітозану є час інкубації та середовище, в яке він вноситься. Безсумнівно, під час розробки методів індукованої стійкості рослин необхідно враховувати зв'язки, що існують між особливостями життєдіяльності фітопатогенів та обміном речовин рослин-живителів в онтогенезі.

Отже, розуміння різних факторів, які впливають на антифунгальну активність хітозану, є ключовим питанням для кращого використання та ефективнішої оптимізації препаратів хітозану, щоб зробити їх більш

придатними для польових застосувань і контролю рослинних захворювань. Більше того, використання хітозану в антимікробних системах повинно ґрунтуватися на достатніх знаннях про складні механізми його способу дії на фітопатогени та рослини, що збільшить шанс його успішного використання для пригнічення поширення хвороби в рослині.

Висновки до 6 розділу:

1. Визначено видовий склад, рівень заселення і частота трапляння мікроміцетів філоплани, ризоплани та ризосфери *F. ananassa*.
2. Доведено, що за обробки НМХ видовий склад філоплани суниці садової суттєво відрізняється від контрольної групи рослин (коефіцієнт спільності Стугрена-Радулеску $\rho=1,0$). Не спостерігалось відмінності у видовому складі мікроміцетів виділених із поверхні листків суниці оброблених високомолекулярним хітозаном за різної експозиції ($\rho=0,40$).
3. Підтверджено, що міцелій переважної більшості грибів є малочутливим до обробки листків розчинами хітозану та його похідних, тому застосування біоплімеру для захисту рослин доцільно проводити у період інтенсивного спороношення фітопатогенів, який є значно чутливішим до їхнього впливу.

Матеріали розділу опубліковано у працях [19, 42]

РОЗДІЛ 7.

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ХІТОЗАНУ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОЗИЦІЙ НА ЙОГО ОСНОВІ

7.1. Антибактеріальна та антифунгальна дія хітозану та сорбінової кислоти

Завдяки великій кількості функціональних груп у хітозані забезпечується можливість утворення між полімером-хітозаном і іншими хімічними сполуками зв'язків різної міцності, що дозволяє регулювати швидкість виходу препарату і його активність. Тому хітозан широко використовують в якості біологічного носія препаратів, що розкладається, різної спрямованості, що забезпечує їх ефективну і пролонговану дію. У розчиненому вигляді хітозан - універсальний сорбент, оскільки при набуханні здатний міцно утримувати у своїй структурі розчинник, а також розчинені і зважені в ньому речовини як органічної, так і неорганічної природи. З огляду на перераховані вище властивості хітозану, а саме гарну розчинність в воді і здатність утримувати в структурі розчинені у воді речовини, були проведені дослідження можливості комплексного внесення хітозану з іншими сполуками, які могли б підсилити його пригнічуючу дію на фітопатогенні мікроорганізми, а саме з сорбіновою кислотою.

Дослідження проводились за наступною схемою:

1. Розчин хітозану (0,1-10% w/v).
2. Розчин сорбінової кислоти у концентрації 0,2-0,4%.
3. Композицію хітозану (0,2-0,5%) та сорбінової кислоти (0,2-0,4%), суміш хітозану(0,2-0,5%), сорбінової кислоти(0,2-0,4%) і води (1:1 та 1:0,5).
4. У якості контролю використовували стерильну воду.
5. Хімічним еталоном у дослідженнях з мікроміцетами був 0,1% розчин системного фунгіциду Фундазол 50% з.п.; з ізолятами бактерій – антибіотик азітроміцин. Розчини речовин готували згідно з інструкціями виробника.

Встановлено диференціацію антибактеріальної активності та пролонгованості дії хітозану, сорбінової кислоти та їх суміші щодо різних ізолятів та штамів фітопатогенних бактерій (табл.7.1., рис.7.1.-7.2.).

Таблиця 7.1.

Антибактеріальна активність хітозану, сорбінової кислоти та їх композицій

№ п/п	Варіанти дослідів	Діаметр зони відсутності росту (мм) штамів збудників навколо лунок з розчинами, на 2-гу добу експозиції				
		Ізолят PSP-35	Ізолят PP-43	Ізолят PSP-31	<i>Cms</i> 7750	<i>Pcc</i> 8982
1	Контроль (вода)	0	0	0	0	0
2	Хітозан (0,1-0,3%)	7,1±0,02	2,4 ±0,03	7,0±0,03	5,0±0,12	3,0±0,04
3	Сорбінова кислота (СБК), 0,2-0,4%	3,0±0,01	2,4±0,01	3,0±0,02	4,0±0,25	4,0±0,03
4	Хімічний еталон, 0,1%	20,6±2,13	16,4±1,03	18,4±0,14	25,0±3,2	15,0±2,13
5	Хітозан (0,2-0,5%) + СБК (0,2-0,4%) + H ₂ O (1:1)	-	3,0±0,01	8,2±0,04	5,5±0,02	6,2±0,04
6	Хітозан (0,2%-0,5%) + СБК (0,2-0,4%) + H ₂ O (1:0,5)	-	5,1±0,02	8,4±0,01	6,3±1,2	7,5±1,12
7	Хітозан (0,2%-0,5%) + СБК (0,2-0,4%)	-	6,4±0,11	9,6±0,03	7,4±1,01	6,0±0,05

Примітка: Різниця між експериментом і контролем достовірна за $p < 0,05$, результати представлені як $M \pm n$, $n=3$.

Так, спостерігався бактеріостатичний ефект суміші хітозану і сорбінової кислоти у варіанті з бактеріальними ізолятами PSP-31, PSP-33; який було відмічено на 5-ту добу експозиції культур. У ізолятів PP-42 та PSP-35 спостерігали біоцидну дію окремо хітозану (діаметр зони відсутності росту становив 17,6 мм) та бактеріостатичну дію окремо сорбінової кислоти. Проте, для даних ізолятів комплекси хітозану та сорбінової кислоти не викликали бактеріостатичного ефекту.

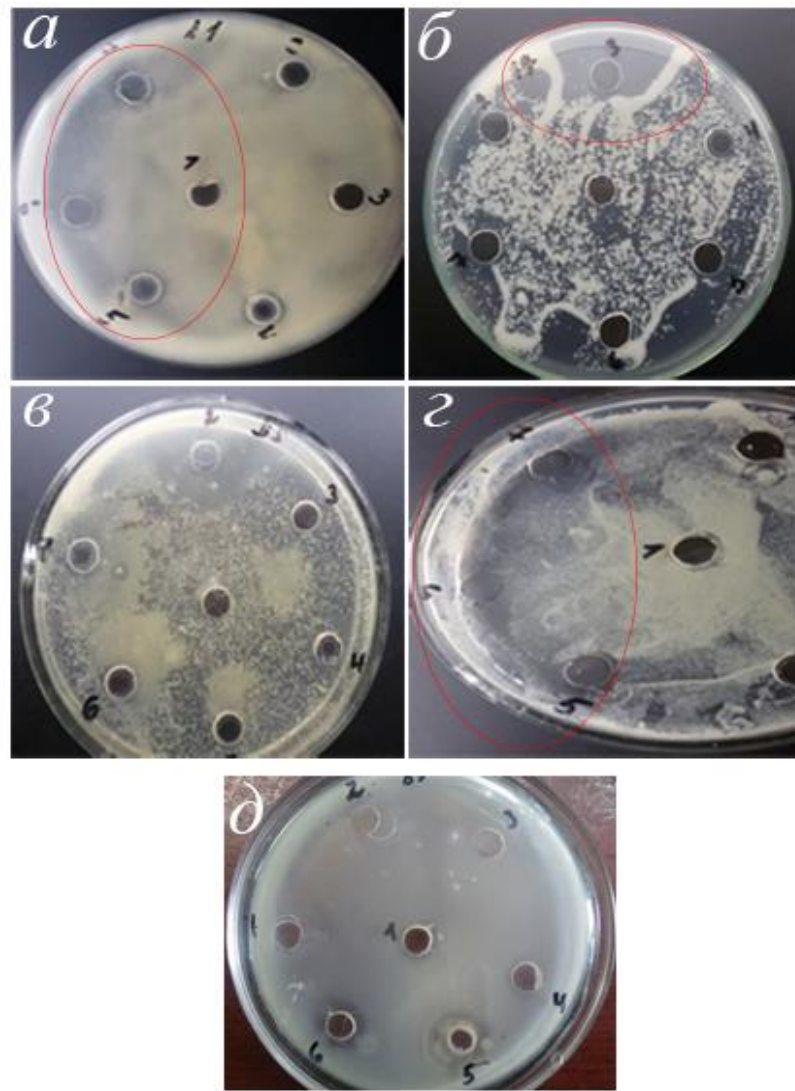


Рис. 7.1. Дослідження бактеріостатичної пролонгованої дії хітозану та його суміші з сорбіновою кислотою на 5 день експозиції: а – PSP-31; б – PSP-35; в – PP-43; г - *Cms* 7750; д - *Pcc* 8982; (1- контроль, 2 – хітозан (0,1-0,3%), 3 – сорбінова кислота (0,2-0,4%), 4 – хімічний еталон (Фундазол, 0,1%), 5 – суміш хітозану(0,2-0,4%), сорбінової кислоти(0,2-0,4%) і води (1:1), 6 - суміш хітозану (0,2-0,4%), сорбінової кислоти (0,2-0,4%) і води (1:0,5), 7 - суміш хітозану(0,2-0,4%) і сорбінової кислоти (0,2-0,4%).

На 6-ту добу експозиції у варіанті із сумішшю хітозану, сорбінової кислоти та дистильованої води у співвідношенні 1:0,5 діаметр зони відсутності росту *C. michiganisens* навколо лунки з розчином становив 6,4 мм. За використання окремо хітозану та сорбінової кислоти у досліді з різними

бактеріальними ізолятами, діаметр зони відсутності росту навколо лунок з розчинами ізоляту PSP-31 збудників коливався в межах 3,0-7,0 мм, в той час як у варіантах із композицією речовин – 8,2-9,6 мм, ізоляту PP-43 – 2,4 проти 3,0-6,4 мм, штамів *Cms* 7750 – 4,0-5,0 проти 5,5-7,4 мм, *Pcc* 8982 – 3,0-4,0 проти 6,0-7,5 мм.

Встановлено, що хітозан (0,1-0,3%) має пролонговану біоцидну дію проти ізоляту PSP-31, штамів *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms* 7750) та *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc* 8982) (Рис. 7.2.).

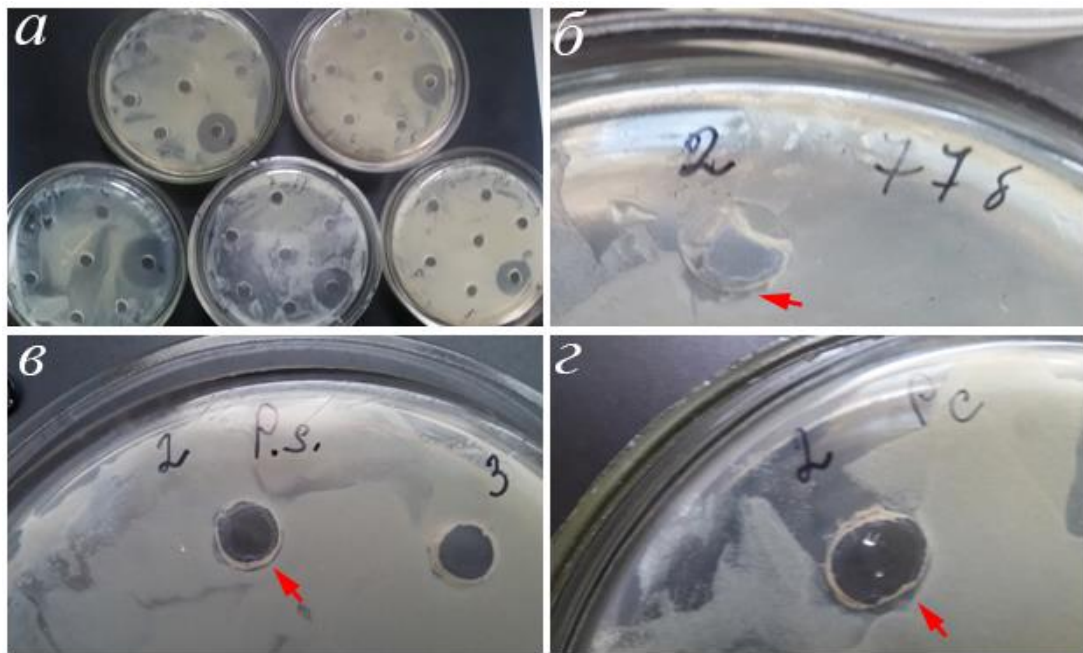


Рис. 7.2. Дослідження пролонгованої біоцидної дії хітозану (0,1-0,3%) на 2 добу експозиції: а – досліджувані культури; б – *Cms* 7750; в – PSP-31; г – *Pcc* 8982.

На 6-ту добу експозиції за дії хітозану діаметр відсутності росту складав: для PSP-31 – 7,0 мм, для *Cms* 7750 – 5,2 мм. Дещо нижчим даний показник був для *Pcc* 8982 – 2,7 мм. У ізолятів PSP-33, PP-42, було відмічено зменшення щільності колоній, менш інтенсивне наростання біомаси клітин, проте суттєвого пригнічення росту не відбувалося.

Вивчення антифунгальної дії хітозану та сорбінової кислоти проводили на ізолятах мікроміцетів родів *Fusarium* та *Alternaria* (рис. 7.3.). Встановлено,

що композиція хітозану і сорбінової кислоти сприяла пригніченню росту міцелію ізолятів збудників родів *Fusarium* та *Alternaria* (табл. 7.2.).

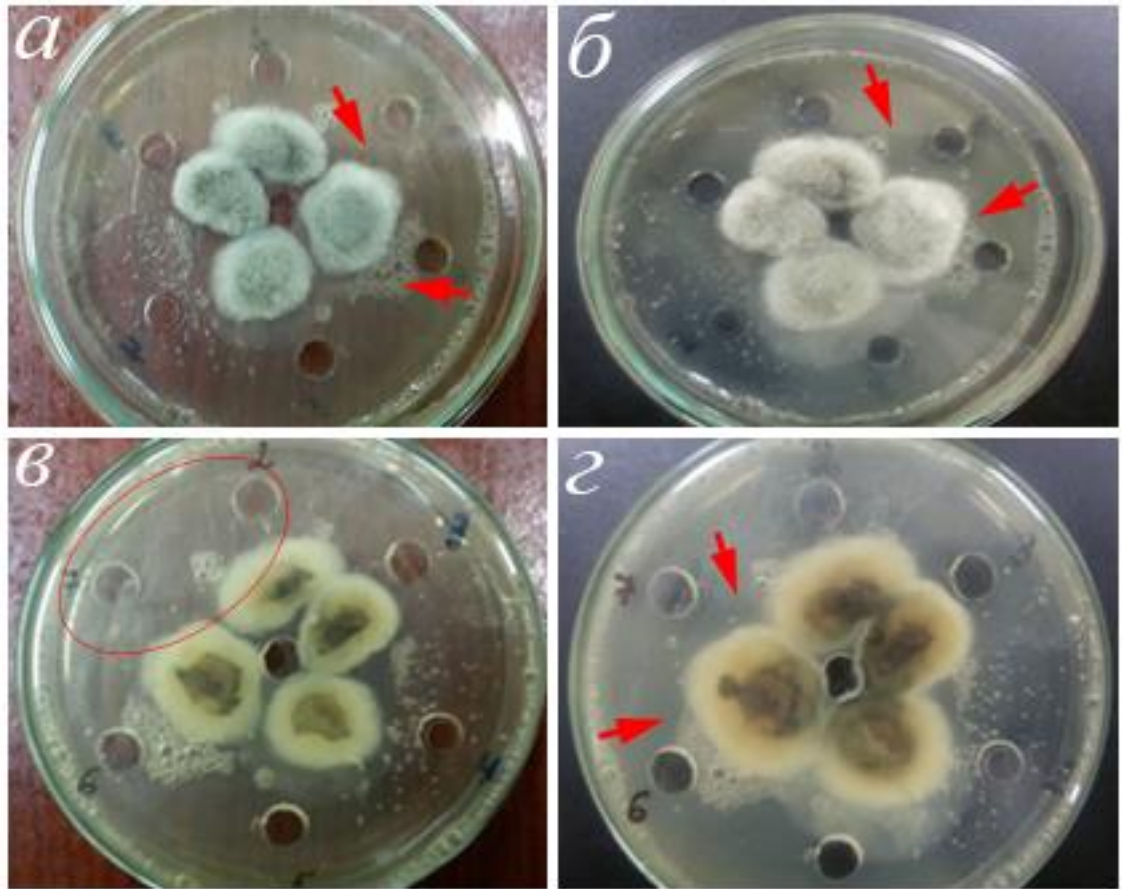


Рис. 7.3. Дослідження фунгістатичної дії хітозану та його суміші з сорбіновою кислотою на роди *Fusarium* (а – 2-га доба експозиції, б – 5-та доба експозиції) та *Alternaria* spp. (в – 2-га доба експозиції, г – 5-та доба експозиції). 1- контроль, 2 – хітозан (0,1-0,3%), 3 – сорбінова кислота (0,2-0,4%), 4 – хімічний еталон (Фундазол, 0,1%), 5 – суміш хітозану(0,2-0,4%), сорбінової кислоти(0,2-0,4%) і води (1:1), 6 - суміш хітозану (0,2-0,4%), сорбінової кислоти (0,2-0,4%) і води (1:0,5), 7 - суміш хітозану(0,2-0,4%) і сорбінової кислоти (0,2-0,4%).

Діаметр зони відсутності росту навколо лунок з розчинами на 3-тю добу експозиції у варіантах окремо з хітозаном та сорбіновою кислотою ізолятів збудників FO -23 та FS-14 коливався в межах 4,9-8,5 мм, АТ-35 та АТ-37 – 6,8-14,1 мм.

Таблиця 7.2.

Антифунгальна активність хітозану та сорбінової кислоти

№ п/п	Варіанти дослідів	Діаметр зони відсутності росту (мм) ізолятів збудників навколо лунок з розчинами на 3-тю добу експозиції				
		FO-23	FO-21	FS-14	AT-35	AT-37
1	Контроль (вода)	0	0	0	0	0
2	Хітозан (0,1-0,3%)	8,5±0,6	-	8,0±1,2	14,1±1,3	9,1±1,1
3	Сорбінова кислота (СБК), 0,2-0,4%	4,9±0,1	-	6,8±1,1	12,3±1,1	6,8±0,7
4	Хімічний еталон, 0,1%	13,6±1,3	11,6±1,3	12,4±1,3	19,4±1,2	12,9±1,2
5	Хітозан (0,2-0,5%)+ СБК (0,2-0,4%) + H ₂ O (1:1)	9,5±0,3	-	8,4±0,2	15,8±0,8	9,6±0,4
6	Хітозан (0,2%-0,5%)+ СБК (0,2-0,4%)+ H ₂ O (1:0,5)	10,6±0,7	-	10,8±0,1	15,3±1,4	11,7±0,5
7	Хітозан (0,2%-0,5%) + СБК (0,2-0,4%)	9,0±1,1	-	9,6±0,4	18,6±1,5	16,4±1,3

Примітка. Різниця між експериментом і контролем достовірна за $p < 0,05$, результати представлені як $M \pm n$, $n=3$

Суміш речовин пригнічувала ріст міцелію, при цьому діаметр зони відсутності росту становив 8,4-10,8 мм та 9,6-18,6 мм відповідно, що свідчить про синергичний ефект взаємодії речовин щодо фітопатогенних мікроміцетів. У ізоляту FO - 21 спостерігали послаблення інтенсивності розвитку міцелію і спороношення.

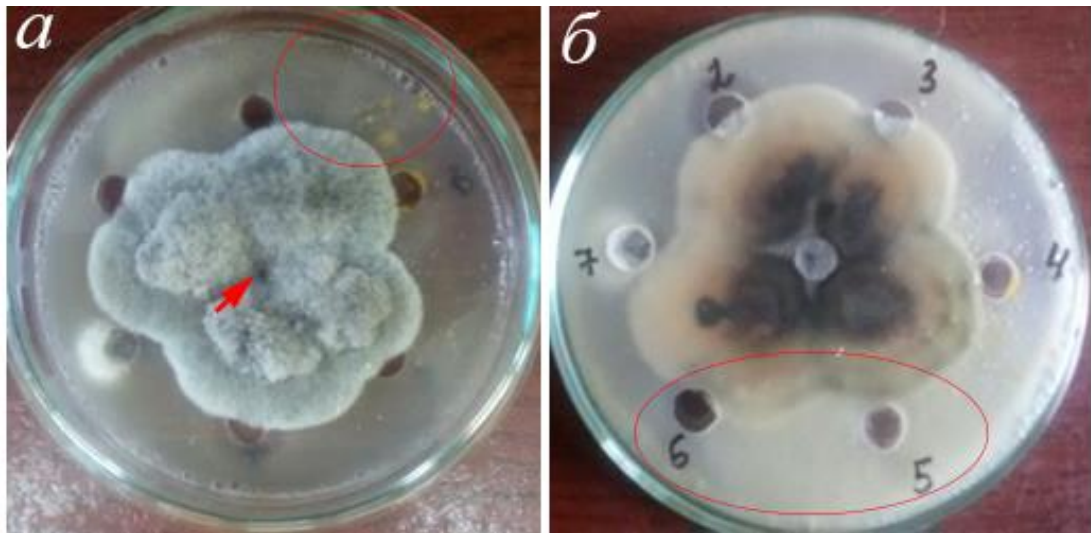


Рис. 7.4. Дослідження фунгістатичної пролонгованої дії хітозану та його суміші з сорбіновою кислотою на 11 добу експозиції: а – *Fusarium* spp., б – *Alternaria* spp. (1- контроль, 2 – хітозан (0,1-0,3%), 3 – сорбінова кислота (0,2-0,4%), 4 – хімічний еталон (Фундазол, 0,1%), 5 – суміш хітозану(0,2-0,4%), сорбінової кислоти(0,2-0,4%) і води (1:1), 6 - суміш хітозану (0,2-0,4%), сорбінової кислоти (0,2-0,4%) і води (1:0,5), 7 - суміш хітозану(0,2-0,4%) і сорбінової кислоти (0,2-0,4%)

Пролонгована дія суміші компонентів має велике значення за тривалого зберігання рослинної продукції. Так, досліджено, що рослинна продукція збільшує термін зберігання за використання хітозану. За рахунок утворення напівпроникної плівки, регулюється газообмін і зменшуються втрати від транспірації, може затримуватись дозрівання плодів.

7.2. Антимікробна дія біологічно активної композиції на мікроорганізми-антагоністи

За проведення оцінки антагоністичної активності виділеного ізоляту-антагоністу методом перпендикулярних штрихів встановлено його активність щодо збудника *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (рис. 7.5).

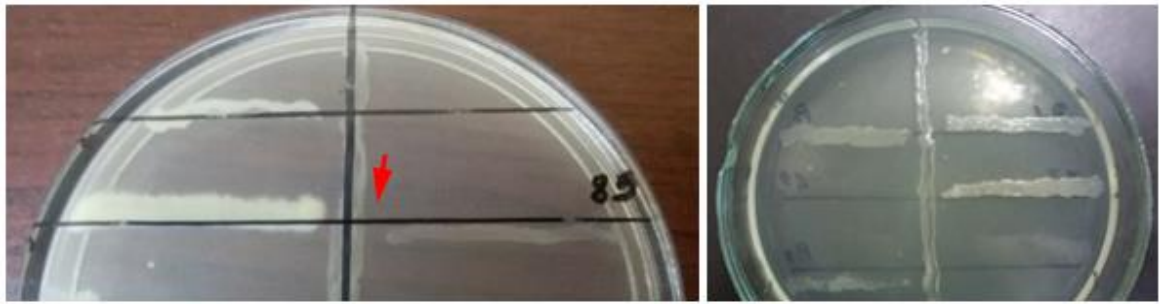


Рис. 7.5. Антагоністична взаємодія ізоляту-антагоністу та ізолятів бактерій, що спричинюють бактеріози рослин

За взаємодії ізоляту з сорбіновою кислотою та хітозаном спостерігається посилення антагоністичної дії (рис. 7.6).



Рис. 7.6. Ефективність комплексу бактерії-антагоністи + хітозан + сорбінова кислота щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)

Також мікроміцети-антагоністи роду *Trichoderma* за взаємодії з розчином сорбінової кислоти проявили більш виражену антагоністичну дію по відношенню до *Fusarium* spp. (рис. 7.7.).



Рис. 7.7. Ефективність комплексу *Trichoderma* spp. + хітозан + сорбінова кислота щодо *Fusarium* spp.

З метою вивчення ефективності застосування сорбінової кислоти і метаболітів мікроорганізмів-антагоністів, отримані ізоляти вирощували на рідкому живильному середовищі за безперервного перемішування протягом 48 год на роторній качалці з 160-180 об./хв за температури $+20 \pm 1^\circ\text{C}$ (рис. 7.8).

Сорбінова кислота виявила стимулюючий ефект щодо наростання біомаси мікроорганізмів-антагоністів, спороутворення грибів роду *Trichoderma*.



Рис. 7.8. Культуральна рідина мікроорганізмів-антагоністів, отримана методом глибинного культивування

Відомо, що на антимікробну активність сорбінової кислоти обернено впливають значення рН, більш висока активність спостерігається при меншому значенні рН. Після 48 год. спостерігали диференціацію зміни рН середовища за культивування бактерій та мікроміцетів (рис. 7.9-7.10).

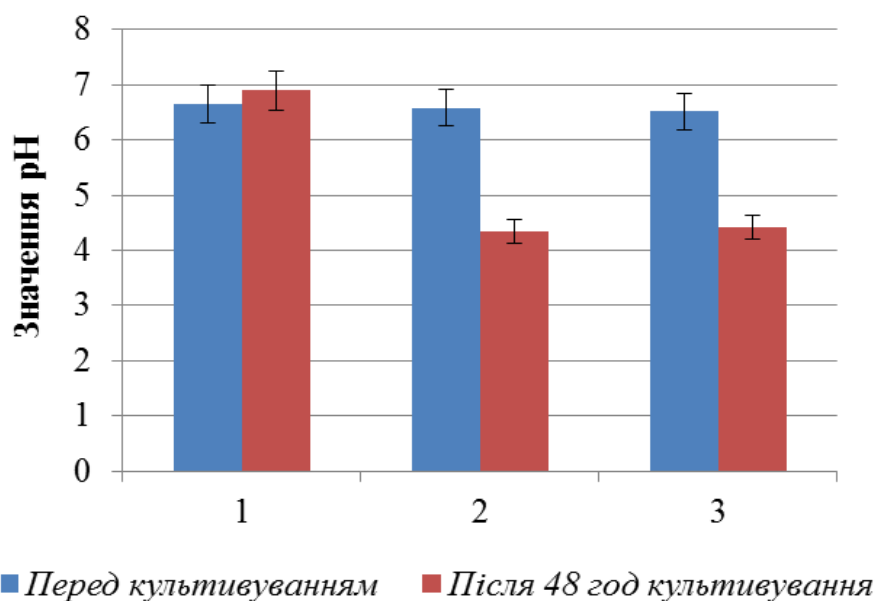


Рис. 7.9. Зміна рН середовища, модифікованого сорбіновою кислотою (СБК), за глибинного культивування *бактерій-антагоністів* (1 – контроль (без СБК); 2 – СБК (0,01-0,05%); 3 – СБК (0,02-0,07%))

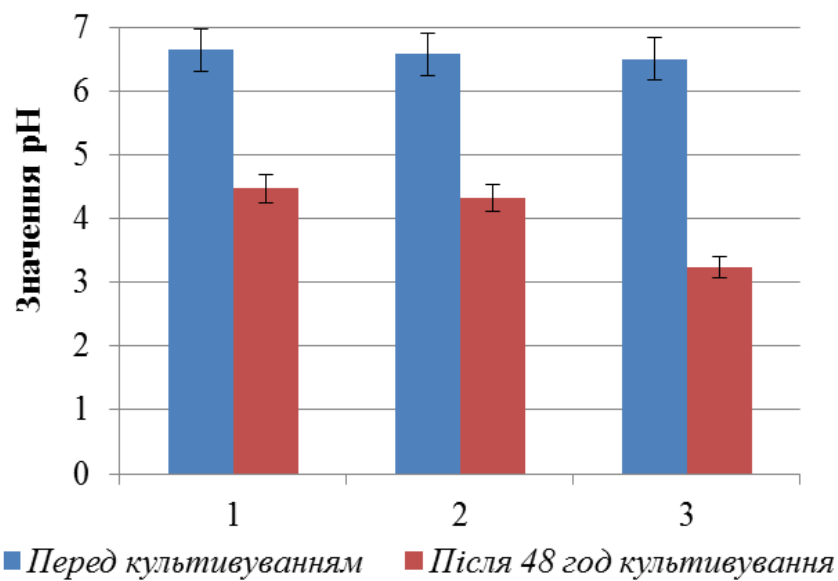


Рис. 7.10. Зміна рН середовища, модифікованого сорбіновою кислотою (СБК), за глибинного культивування *Trichoderma* spp. (1 – контроль (без СБК); 2 – СБК (0,01-0,05%); 3 – СБК (0,02-0,07%))

7.3. Антимікробні властивості біологічно активної композиції та екзометаболітів штамів-антагоністів

Процес спороутворення мікроорганізмів часто корелює з біосинтезом антибіотиків, пригнічення процесу спороутворення гальмує біосинтез антибіотиків. Так, синтез окремими штамми *Trichoderma* комплексів антибіотиків з антибактеріальною і антимікотичною дією тісно пов'язаний зі спороутворенням при вирощуванні штаму. В окремих експериментах показано, що сорбінову кислоту застосовують для пригнічення конідієгенезу цвільових мікроміцетів *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger*, що спричиняють псування харчової продукції.

Більш інтенсивно процес спороутворення у мікроміцетів-антагоністів роду *Trichoderma* відбувався за присутності у середовищі сорбінової кислоти. У подальшому досліджували антимікробну активність отриманих екзометаболітів.

Відмічається диференція антагоністичної дії композиції мікроорганізм-антагоністи+сорбінова кислота за цільовим об'єктом та за тривалістю експозиції (рис.7.11, табл.7.3-7.4).

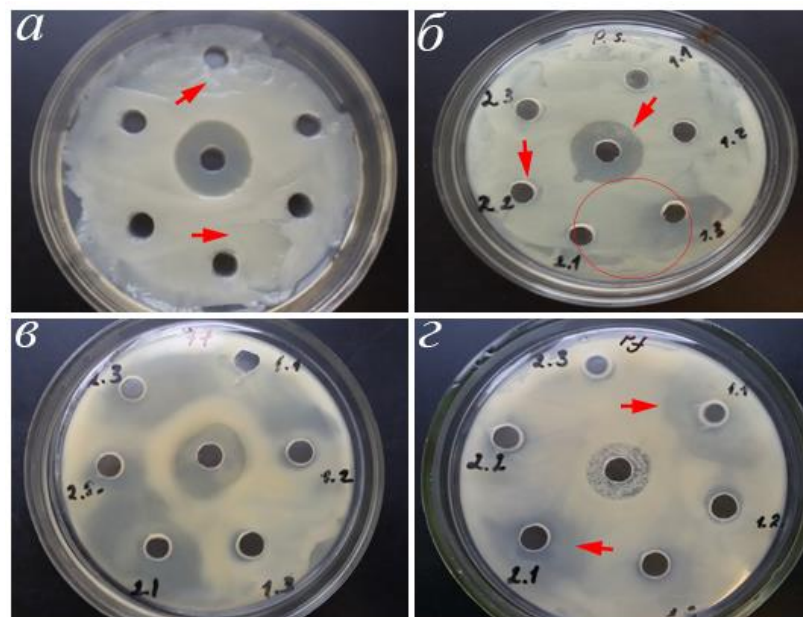


Рис. 7.11. Антимікробна дія композиції сорбінової кислоти та екзометаболітів мікроорганізмів-антагоністів

Таблиця 7.3.

Антибактеріальна активність композиції сорбінової кислоти та
екзометаболітів (ЕМ) мікроорганізмів-антагоністів

Варіанти дослідів	Діаметр зони відсутності росту (мм) штамів збудників навколо лунок з розчинами на 5-ту добу експозиції				
	Ізолят PSP-35	Ізолят PP-43	Ізолят PSP-31	<i>Cms</i> 7750	<i>Pcc</i> 8982
Еталон (розчин антибіотику)	8,5±0,3	13,2±0,5	9,7±0,4	13,6±1,1	20,4±1,2
Контроль (екзометаболіти (ЕМ) бактерій-антагоністів)	7,6±0,5	4,1±0,02	3,5±0,02	-	-
Сорбінова кислота+ ЕМ бактерій-антагоністів (0,01-0,05%)	4,2±0,4	2,3±0,01	4,5±0,02	3,3±0,02	-
Сорбінова кислота+ ЕМ бактерій-антагоністів (0,02-0,07%)	2,2±0,03	-	5,3±0,02	4,5±0,02	8,5±1,2
Контроль (екзометаболіти <i>Trichoderma</i> spp.)	6,0±0,04	4,0±0,1	+	9,4±0,7	-
Сорбінова кислота + ЕМ <i>Trichoderma</i> spp. (0,01-0,05%)	-	3,2±0,3	3,2±0,1	5,2±0,3	-
Сорбінова кислота + ЕМ <i>Trichoderma</i> spp. (0,02-0,07%)	-	-	4,8±0,05	8,3±0,1	-

Примітка. Різниця між експериментом і контролем достовірна за $p < 0,05$, результати представлені як $M \pm n$, $n=3$.

У ізоляту PSP-31 найефективнішою виявилась композиція екзометаболітів та сорбінової кислоти (0,02-0,07%) – 4,8- 5,3 мм проти 3,2-4,5 мм у решти варіантів.

Дещо меншою виявилась антифунгальна активність досліджуваних речовин щодо патогенів (рис. 7.12, табл. 7.4.). В основному антифунгальну активність до більшості ізолятів і штамів проявили екзометаболіти мікроорганізмів-антагоністів, у ізоляту ІЗ FS-14 у варіанті сорбінова кислота+ ЕМ бактерій-антагоністів (0,01-0,05%) спостерігали найбільший діаметр зони відсутності росту – 6,7 мм проти 4,5-6,1 мм.

Таблиця 7.4.

Антифунгальна активність композиції сорбінової кислоти та екзометаболів
(ЕМ) мікроорганізмів-антагоністів

Варіанти дослідів	Діаметр зони відсутності росту (мм) ізолятів збудників навколо лунок з розчинами на 5-ту добу експозиції				
	FO-23	FO-21	FS-14	AT-35	AT-37
Еталон (розчин фунгіциду)	5,2±0,5	4,6±0,6	6,7±0,2	3,0±0,04	2,8±0,05
Контроль (екзометаболіти (ЕМ) бактерій-антагоністів)	-	6,2±0,2	5,1±0,1	4,8±0,3	4,3±0,2
Сорбінова кислота+ ЕМ бактерій-антагоністів (0,01-0,05%)	-	-	6,7±0,4	-	-
Сорбінова кислота + ЕМ бактерій-антагоністів (0,02-0,07%)	-	-	4,5±0,2	-	-
Контроль (екзометаболіти <i>Trichoderma</i> spp.)	4,1±0,3	-	6,4±0,1	5,2±0,2	4,9±0,3
Сорбінова кислота+ ЕМ <i>Trichoderma</i> spp. (0,01-0,05%)	-	-	-	-	-
Сорбінова кислота + ЕМ <i>Trichoderma</i> spp. (0,02-0,07%)	-	-	-	-	-

Примітка. Різниця між експериментом і контролем достовірна за $p < 0,05$, результати представлені як $M \pm n$, $n=3$.

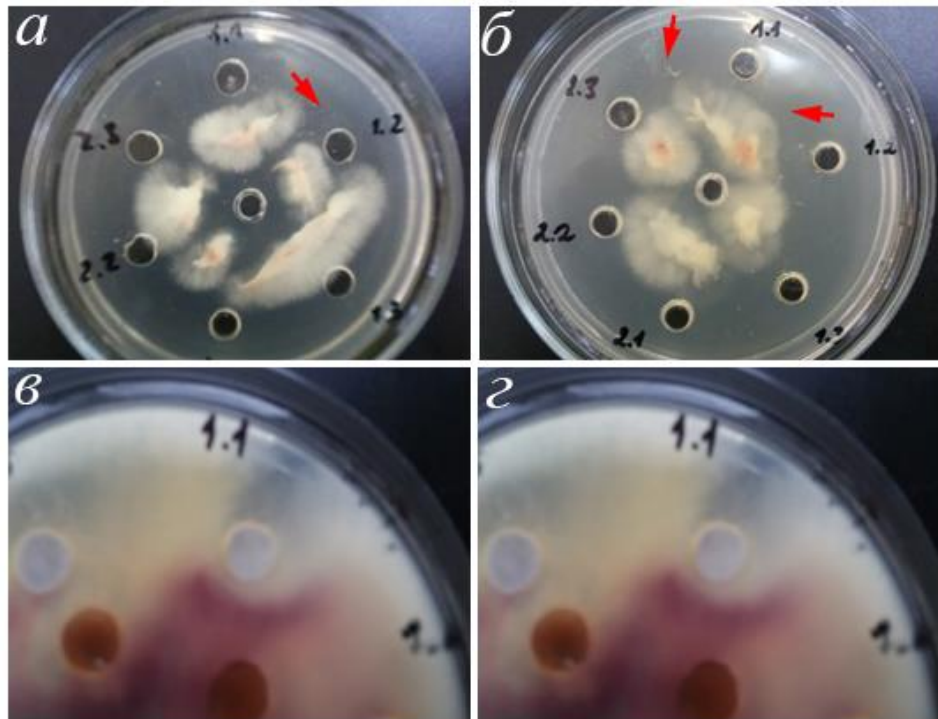


Рис. 7.12. Антимікробна дія композиції сорбінової кислоти та екзометаболітів мікроорганізмів-антагоністів на ізолят FS-14: а, б – 2-га доба експозиції, в, г – 5 доба експозиції

Таким чином, потребує всестороннього дослідження вивчення ефективності препаратів хітозану різного біологічного походження та його композицій з органічними кислотами для захисту від фітопатогенних мікроорганізмів.

Зважаючи на глобальну тенденцію до поступового переходу до органічного виробництва, вивчення механізмів дії хітозану та його сполук з органічними кислотами є перспективним напрямком досліджень у контролі патогенних мікроорганізмів за зберігання плодоовочевої продукції.

Висновки до 7 розділу:

1. Доведено диференціацію антимікробної активності та пролонгованості дії хітозану, сорбінової кислоти та їх суміші щодо різних ізолятів та штамів фітопатогенних мікроорганізмів. Так, спостерігався бактеріостатичний ефект суміші хітозану і сорбінової кислоти у варіанті з

бактеріальними ізолятами PSP-31 та PSP-33, який було відмічено і на 5-ту добу експозиції культур.

2. Встановлено бактеріостатичний ефект суміші хітозану і сорбінової кислоти у варіанті з бактеріальними ізолятами, який спостерігався протягом 5 діб експозиції культур. Композиція хітозану і сорбінової кислоти сприяла пригніченню росту міцелію ізолятів збудників родів *Fusarium* та *Alternaria*.

3. Показано, що комплекс хітозану з сорбіновою кислотою має пролонговану антибактеріальну дію щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. На 5-ту добу експозиції запропонована композиція стримувала ріст бактеріальних колоній у більшому ступені порівняно з хімічним еталоном.

4. Продемонстровано, що мікроміцети-антагоністи роду *Trichoderma* за взаємодії з розчином сорбінової кислоти проявили більш виражену антагоністичну дію по відношенню до *Fusarium* spp.

Матеріали розділу опубліковано у працях [10]

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/л) 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, елагітанінів 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 рази до ізоляту PSP-31, у 1,23–2,7 рази – 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 рази – проти *Alternaria* spp.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ахмеджанов И. Г. Регуляция биосинтеза фитоалексинов в инфицированных возбудителем вертициллезного вилта тканях хлопчатника. Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 6. С. 535–540.
2. Багирова С. Ф., Джавахия В. Г., Дьяков Ю. Т., Озерецковская О. Л., Проворов Н. А., Тихонович И. А., Щербакова Л. А. Фундаментальная фитопатология. М.: КРАСАНД, 2012. 512 с.
3. Беликов В.В., Шрайбер М.С. Методы анализа флавоноидных соединений. Фармация. 1970. № 1. С. 68-72.
4. Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. Методы исследования возбудителей болезней растений. Киев: Наукова думка, 1968. 316 с.
5. Беркович Л. А., Тимофеева Г. И., Цюрупа М. П., Даванков В. А. Гидродинамические и конформационные параметры хитозана. Высокомолек. соедин. 1980. Т. (А) 22. № 8. С. 1834–1841.
6. Бёттхер И., Ветцель Т., Древе Ф. В., Кеглер Х., Науманн К., Фрайер Б., Фрауэнштайн К., Фукс Э. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. Пер. с нем. К. В. Попковой и В. А. Шмыгли. Москва : Агропромиздат, 1987. 224 с.
7. Билай В. И. ред. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев: Наукова думка, 1982. 550 с.
8. Билай В. И., Гвоздяк Р. И., Скрипаль И. Г., Краев, В. Г., Элланская И. А., Зирка Т. И., Мурас В. А. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. Справочник. Киев: Наукова думка, 1988. 549 с.
9. Борисова Г. Г., Ермошин А. А., Малеева М. Г., Чукина Н. В. Основы биохимии вторичного обмена растений: учеб-метод. пособие. Екатеринбург: изд-во урал. ун-та, 2014. 128 с.

10. 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.
11. Бутенко Р. Г., Шамина З. Б., Фролова Л. В. Индуцированный органогенез и характеристика растений, полученных в культуре тканей табака. Генетика. 1967. №3. С.29–38.
12. Бутенко Р.Г. Биотехнология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК Пресс, 1999. 159 с.
13. Буткевич Т. В., Варламов В. П., Евдокимов И. А., Алиева Л. Р., Курченко В. П. Использование хитозана в производстве молочных продуктов. Труды БГУ. 2014. Т. 9. Ч. 2. С. 181–190.
14. Быкова В. М., Немцев С. В. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана: Хитин, его строение и свойства. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. С. 7–23
15. Валиева А. И., Абдрахимова Й. Р. Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты (Часть 3. Фенольные соединения): Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский Федеральный университет, 2010. 40 с.
16. Варламов В. П., Ильина А. В., Шагдарова Б. Ц., Луньков А. П., Мысякина И. С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
17. Васюкова Н. И., Озерецковская О. Л. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
18. Васюхно Ю. П., Ліханов А. Ф., Субін О. В. Мікроклональне розмноження суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) сорту Аліна в культурі *in vitro*. IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», м. Київ, 21-22 травня 2015: тези доповіді. Київ, 2015. С. 18.

19. 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.

20. Воłyнец А. П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск: Беларус. навука, 2013. 283 с.

21. Воłyнец А. П. Фенольные соединения как компоненты естественного фитоиммунитета. Проблемы экспериментальной ботаники: Купревичские чтения I. Минск: Тэхналогія, 1998. С. 32–42.

22. Воłyнец А. П., Прохорчик Р. А. Ароматические оксисоединения – продукты и регуляторы фотосинтеза: монография. Минск, 1983. 156 с.

23. Воłyнец А.П., Шуканов В.П., Полякова Н.В., Башко Н.П., Недведь Е.Л., Мельникова Е.В., Корытько Л.А., Карпук В.В., Манжелесова Н.Е., Полянская С.Н., Голуб И.А., Шанбанович Г.Н., Савельев Н.С. Физиология патогенеза и болезнеустойчивости растений. Минск: Беларуская навука, 2016. 252 с.

24. Гамзазаде А. И. Структурная неоднородность как фактор изменчивости свойств хитина и хитозана. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. Москва: Наука, 2002. С.112–118.

25. Гамзазаде А. И., Скляр А. М., Павлова С. А., Рогожин С. В. О вязкостных свойствах растворов хитозана. Высокомолек. соед. 1981. Т. (А) 23. № 3. С. 594–597.

26. Георгиевский В. П., Комиссаренко Н. Ф., Дмитрук С. Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск: Наука. Сиб. Отд-ние, 1990. 333 с.

27. Герхард Ф. (ред.) Методы общей бактериологии. Т. 1. Пер. с англ. Москва, 1983. 536 с.

28. Головин С. Е., Глинушкин А. П., Зеркалов И. А., Белошапкина О. О., Копина М. Б. Патокомплекс почвенных микромицетов, ассоциирующихся с

корневыми и прикорневыми гнилями земляники, в некоторых регионах России. Достижения науки и техники АПК. 2019. Т. 33. № 7. С. 62–70.

29. Горшкова Т. А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 429 с

30. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений: Ред. К. М. Сытник. 2-е изд. испр. и доп. К.: Наук. думка, 1973. 591 с.

31. Гудков С. В., Брусков В. И., Куликов А. В., Бобылёв А. Г., Куликов Д. А., Молочков А. В. Биоантиоксиданты (часть 1). Альманах клинической медицины. 2014. № 31 С. 61–65.

32. Дмитриев А. П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс. Физиология растений. 2003. 50 (3). С. 465–474.

33. Дмитриев А. П. Сигнальные системы иммунитета. Цитология и генетика. 2002. №36 (3). С. 58–65.

34. Загорска Н. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Изучение растений-регенерантов, полученных в культуре тканей табака. Генетика. 1971. Т. 7. № 3. С. 23–29.

35. Загоскина Н. В., Бурлакова Е. Б. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Науч. мир, 2010. 400 с.

36. Запрометов М. Н. Фенольные соединения. Москва, 1993. 272 с.

37. Запрометов М. Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. LVI Тимирязевские чтения. М.: Наука, 1996. 45 с.

38. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка, 1980. 488 с.

39. Каминский В., Теслюк В., Григорюк И., Дубровин В. Эффективность грибных полисахаридов в повышении устойчивости растений против болезней. Збірник наукових праць ННЦ “Інститут землеробства НААН”. 2014. №4. С. 109–116.

40. Карпук В. В. Структурная организация патогенеза злаков, вызываемого грибной инфекцией: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Минск, 2000. 42 с.

41. Карпун Н. Н., Янушевская Э. Б., Михайлова Е. Б. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе. Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50, № 5. С. 540–549.

42. 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., за ред. О.Л. Кляченко. Біополімерні комплекси та гетероциклічні сполуки в системі захисту рослин: монографія. Київ: ФОП Ямчинський, 2020. 227 с.

43. Кляченко О. Л., Ліханов А. Ф., Присяжнюк Л. М., Клюваденко А. А., Субін О. В. Науково-методичні рекомендації "Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин". Київ, 2019. 35 с.

44. Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов. Физиология и биохимия культурных растений. 2013. Т. 45. № 2. С. 113–126.

45. Конарев А. В. Молекулярные аспекты иммунитета растений и их коэволюции с насекомыми. Биосфера. 2017. Т. 9. № 1. С. 79–99.

46. Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків: Колорит, 2007. 188 с.

47. Кудряшов А. П., Дитченко Т. И., Молчан О. В., Смолич И. И., Яковец О. Г. Физиология растений: лабораторный практикум для студентов биологического факультета [Электронный ресурс]. Минск : БГУ, 2011. 76 с.

48. Куликов С. Н., Варламов В. П. Роль структуры в элиситорной активности хитозана. Ученые записки Казанского государственного университета: Естественные науки. 2008. Т. 150. № 2. С.43–58.

49. Куликов С. Н., Тюрин Ю. А., Ильина А. В., Левов А. Н., Лопатин С. А., Варламов, В. П. Антибактериальная активность хитозана и его производных. Труды Белорусского государственного университета: научный журнал. 2009. Т. 4. Ч. 1. С. 90–100.
50. Куликов С. Н., Тюрин Ю. А., Фассахов Р. С., Варламов В. П. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизмы действия и роль структуры. Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунобиологии. 2009. № 5. С. 91–97.
51. Куликов С. Н., Чирков С. Н., Ильина А. В., Лопатин С. А., Варламов В. П. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях. Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224–228.
52. Кулинский И. В. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита. Соросовский образовательный журн. 1999. № 1. С. 2–7.
53. Курдиш І. К. Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми: монографія. К. : Наук. думка, 2010. 253 с.
54. Леонтьев Д. В. Флористический анализ в микологии: учебник для студентов высших учебных заведений. Харьков, 2008. 110 с.
55. Макаренко О. А., Левицкий А. П. Физиологические функции флавоноидов в растениях. Физиология и биохимия культ. растений. 2013. Т. 45. № 2. С. 100–112.
56. Малиновский В. И. PR-белки и фитовирусы. Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 3. С. 1–9.
57. Малиновский В. И. Механизмы устойчивости растений к вирусам. Владивосток: Дальнаука, 2010. 324 с.
58. Мельничук М. Д., Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф., Силаєва А. М., Спірочкіна М. М. Біотехнологія отримання високоякісного садивного матеріалу суниці (*Fragaria ananassa* Duch.): науково-методичні рекомендації. Київ, 2014. 56 с.

59. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері: навчальний посібник. Київ, 2014. 247 с.
60. Молодченкова О. О. Предполагаемые функции салициловой кислоты в растениях. Физиология и биохимия культ. растений. 2001. Т. 33, № 6. С. 463–474.
61. Недведь Е. Л., Серова З. Я., Шалыго Н. В. Влияние грибной инфекции на окислительные процессы у растений-хозяев. Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2007. № 1. С. 12–16.
62. Никитенко П., Хрустицкая Л. Хитозан - полимер будущего. Наука и инновации. 2013. № 9. С. 14–17.
63. Нужная Т. В., Веселова С. В., Максимов И. В. Влияние салициловой кислоты и этилена на устойчивость растений пшеницы к *Septoria nodorum* berk. Вестник Башкирского университета. 2015. Т. 20. №1 С. 92–96
64. Патика В. П., Пасічник Л. А., Гвоздяк Р. І. Петриченко В., Корнійчук О., Калініченко А. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. Монографія. Том 2. Вінниця: ТОВ Віндрук, 2017. 432 с.
65. Петрова А. Д. Упадышев М. Т. Хемотерапия и размножение садовых культур на питательных средах с фенолкарбоновыми кислотами. Сб. науч. работ Плодоводство и ягодоводство России. 2000. Т 7. С. 67–72.
66. Плотникова Л. Я., Штубей Т. Ю. Влияние салициловой и янтарной кислот на фитофизиологические реакции пшеницы, инфицированной бурой ржавчиной. Цитология. 2009. Т. 51. № 1. С. 41–50.
67. Поликсенова В. Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам. Вестник БГУ. Сер. 2. 2009. № 1. С. 48–60.
68. Попова Э. В., Домнина Н. С., Коваленко Н. М., Борисова Е. А., Колесников Л. Е., Тютерев С. Л. Биологическая активность хитозана с разной молекулярной массой. Вестник защиты растений. 2017. №3(93). С.28–33.

69. Прусакова Л. Д. Кефели В. И. Белопухов С. Л. Вакуленко В. В. Кузнецова С. А. Роль фенольных соединений в растениях. Агрохимия. 2008. № 7. С. 86-96.

70. Ревина, А. А., Зайцев П. М. Физико-химические исследования биологически активных соединений фенольной природы. VII Междунар. симп. по фенольным соединениям: фундаментальные и прикладные аспекты. г. Москва, 19-23 октября, 2009: тезисы доклады. Москва, 2009. С. 232–234.

71. Серова З. Я., Гесь Д. К., Карпук В. В. Функции растительных ядер в формировании межвидовых отношений при взаимодействии авто- и гетеротрофных организмов. Клеточные ядра растений – экспрессия и реконструкция. Барановичи, 2001. С. 118–128.

72. Серова З. Я., Карпук В. В. Вовлечение ядер во взаимодействие с ржавчинным патогеном: структурное исследование. II съезд Белор. об-ва физиол. раст.: тезисы докл. Минск, 1995. С. 17–18.

73. Скрыбин К. Г. Вихорева Г. А., Варламов В. П. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 368 с.

74. Соколов Ю. А. Элиситоры и их применение. Весці нацыянальнай акадэміі навук беларусі. серыя хімічных навук. 2014. №4. С. 109–118.

75. Сосновская Т. Ф. Экзогенная салициловая кислота – эликсир протеиназно-ингибиторной системы проростков люпина узколистного. Тез. докл. шестой Междунар. науч. конф. «Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях» (26-28 июля 2001). М.: МСХА, 2001. С.65.

76. Субин А. В., Мельничук М. Д., Лиханов А. Ф., Спирочкина М. Н. Влияние салициловой кислоты на морфогенные процессы *Fragaria ananassa* Duch. в культуре *in vitro*. VIII Международная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», г. Минск, 28-30 октября 2015: тезисы доклада. Минск, 2015. С. 116.

77. Субін О. В. Мікроклональне розмноження високопродуктивних сортів суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.). IV Міжнародна науково-практична конференція молодих учених «Селекція, генетика та технології

виращування сільськогосподарських культур». Центральне, 21 квітня 2016: тези доповіді. с. Центральне, 2016. С. 105.

78. Субін О. В. Мікроклональне розмноження суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) сорту Аліна в культурі *in vitro*. Науковий вісник НУБіП України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. 2015. № 214. С. 281–288.

79. 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 (48). С. 26–33.

80. 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.

81. Сушинская Н. В., Чудновская Е. В., Майорова К. И., Курченко В. П. Элиситорное действие комплексной обработки семян кукурузы олигохитозаном и меланином. Экобиотех. 2019. Т 2. № 3. С.279–285.

82. Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдрасилов Б. С., Музафаров Е. Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronobook, 2013. 310 с.

83. Тарчевский И. А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие. Физиология растений. 2000. 47 (2). С. 321–331.

84. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.

85. Третьякова О. М., Евтушенков А. И. Экспрессия PR-генов при бактериальной инфекции. Труды БГУ. 2011. Т. 6. № 1. С. 163–167.

86. Тютюрев С. Л. Индуцированный фитоиммунитет (молекулярные механизмы и возможность использования в растениеводстве). Купревичские чтения VI. Минск: Тэхнологія, 2007. С. 5–54.

87. Тютюрев С. Л. Научные основы индуцированной устойчивости растений. С-Пб, 2002. 328 с.

88. Тютюрев С. Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам. Вестник защиты растений. 2015. №1 (83). С. 3–13.
89. Федосеева Е. Н., Смирнова Л. А., Федосеев В. Б. Вязкостные свойства растворов хитозана и его реакционная способность. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2008. № 4. С. 59–64.
90. Филипенко Е. А., Кочетов А. В., Канауата У., Малиновский В. И. Шумный В. К. PR-белки с рибонуклеазной активностью и устойчивость растений к патогенным грибам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С.326–334.
91. Харборн Д. Б. Введение в экологическую биохимию. М.: Мир, 1985. 311 с.
92. Чесноков Ю. В. Устойчивость растений к патогенам. Сельскохозяйственная биология. 2007. №1. С. 16–35.
93. Шарипова М. Р., Балабан Н. П., Марданова А. М., Нямсүрэн Ч., Валеева Л.Р. Механизмы устойчивости растений к инфекциям. Уч. зап. Казанского университета. 2013. №155 (4). С. 28–58.
94. Шкаликов В. А., Дьяков Ю. Т., Смирнов А. Н., Джалилов Ф.С.-У., Стройков Ю.М., Коновалов Ю.Б., Грищенко В.В. Иммуитет растений. М.: КолосС, 2005. 190 с.
95. Adams D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology. 2004. V. 150 (7). P.2029–2035.
96. Agostini-Costa T. da S., Vieira R. F., Bizzo H. R., Silveira D. Gimenes M. A. Secondary Metabolites. Chromatography and Its Applications. InTech, 2012. P. 131-164.
97. Agrios G. N. Plant Pathology. Florida: Academic Press, 1997. 952 p.
98. Ahmed I., Dildar L., Haque A., Patra P., Mukhopadhyay M., Hazra S., Kulkarni M., Thomas S., Plaisier J. R., Dutta S. B., Bal J. K. Chitosan-fatty acid interaction mediated growth of Langmuir monolayer and Langmuir-Blodgett films. Journal of Colloid and Interface Science. 2018. V. 514. P.4 33–442.

99. Akimoto-Tomiyama C., Sakata K., Yazaki J., Nakamura K., Fujii F., Shimbo K., Yamamoto K., Sasaki T., Kishimoto N., Kikuchi S., Shibuya N., Minami E. Rice gene expression in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor: comprehensive analysis by DNA microarray with randomly selected ESTs. *Plant Mol Biol.* 2003. V. 52. P.537–551.
100. Albershein P., Nevins D. J., English P. D., Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gasliquid chromatography. *Carbon. Res.* 1976. V 5 (3). P. 340–345.
101. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 2009. V. 3. P. 203–230.
102. Arbia W., Arbia L., Adour L., Amrane A. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods – a review. *Food Technol. Biotechnol.* 2013. V 51. P. 12–25.
103. Atkinson N., Urwin P. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal Of Experimental Botany.* 2012. V.63 (10). P. 3523–3543.
104. Badria Farid A., Aboelmaaty Walaa S. Plant histochemistry: a versatile and indispensable tool in localization of gene expression, enzymes, cytokines, secondary metabolites and detection of plants infection and pollution. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences.* 2019. V. 3 I. 7. P. 88–100.
105. Bautista-Banos S., Hernandez-Lopez M., Bosquez-Molina E. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana Fitopatologia.* 2004. V. 22. P. 178–186.
106. Bavaresco L., Zamboni M., Squeri C., Xu S., Abramowicz A., Lucini L. Chitosan and grape secondary metabolites: a proteomics and metabolomics approach. *BIO Web of Conferences*, 9, 01004, 40th World Congress of Vine and Wine. 2017. P. 1–3.

107. Beart J. E., Lilley T. H., Haslam E. Plant polyphenols – secondary metabolism and chemical defence: some observations. *Phytochemistry*. 1985. V. 24. P. 33–38.
108. Bekale L., Agudelo D. T., Ajmir-Riahi H. A. Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015. № 125. P.309–317.
109. Bent A. F., MacKey D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*. 2007. V. 45. P. 399–436.
110. Berg G., Zachow C., Lottmann J., Götz M., Costa R., Smalla K. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl Environ Microbiol*. 2005. V. 71 (8). P. 4203–4213.
111. Bhaskara Reddy M. V., Arul J., Ait-Barka E., Angers P., Richard C., Castaigne F. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Sci. Technol*. 1998. V. 8. P. 33–43.
112. Bol J. F., Linthorst H. J. M., Cornelissen B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathology*. 1990. V. 28 P. 113–138.
113. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*. 2009. V. 60. P. 379–406
114. Boyes D. C., McDowell J. M., Dang J. L. Plant pathology: Many roads lead to resistance. *Curr. Biol*. 1996. V. 6 (6) P. 634–637.
115. Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science And Technology*. 1995. V. 28 (1). P. 25–30.
116. Brine C., Sandford P., Zikakis J. Advances in chitin and chitosan. London: Elsevier Applied Science, 1992. 708 p.

117. Broun R. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8 (3). P. 272–279.
118. Buchner P., Rochat C., Wuillème S., Boutin J. P. Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β -1, 3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*). *Plant Mol Biol.* 2002. V. 49 (2). P. 171–186.
119. Buee M., De Boer W., Martin F., van Overbeek L., Jurkevitch E. The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil.* 2009. V. 321. P. 189–212.
120. Chen Z., Zheng Z., Huang J., Lai Z., Fan B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* 2009. № 4. P. 493–496.
121. Choi B. K., Kim K. Y., Yoo Y. J. Oh S. J., Choi J. H., Kim C. Y. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus* mutans. *Int J Antimicrob Agents.* 2001. V. 18. P. 553–557.
122. Chuanfu An, Zhonglin Mou. Salicylic acid and its function in plant immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 2011. V. 53 (6). P. 412–428.
123. Chuang H., Chang, P. Y., Syu Y. Harpin protein, an elicitor of disease resistance, acts as a growth promoter in *Phalaenopsis orchids*. *J Plant Growth Regul.* 2014. V. 33. P. 788–797.
124. Cohen Y., Gisi U., Nidennan T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic acid methyl ester. *Phytopathology.* 1993. V. 83. P. 1054–1062.
125. Collinge D. B., Gregersen P. L., Thordal - Christensen H. The nature and role of defence genes in cereals. The powdery mildews: a comprehensive treatise. USA, 2000. P. 147–159.
126. Conrath U. Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science.* 2011. V. 16 (10). P. 524–531.

127. Coqueiro D. S. O., De souza A. A., Takita M. A., Rodrigues C. M., Kishi L. T., Machado M. A. Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid. *BMC genomics*. 2015. V. 16 (1) 288. P. 1–14.
128. Coqueiro D. S. O., Maraschin M., Di Piero R. M. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. *J. Phytopathol.* 2011. V. 159. P. 488–494.
129. Dai J., Mumper R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010 V. 15. P. 7313–7352.
130. D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita* 2007. V. 43. P. 348–361.
131. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R. M., Chiellini E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2011. V. 36. P. 981–1014.
132. Datta S. K., Muthukrishnan S. Pathogenesis-related proteins in plants. N.W.: CRC Press LLC, 1999. 303 p.
133. D'Ayala G. G., Malinconico M., Laurienzo P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*. 2008. V. 13 (9). P. 2069–2106.
134. De Tender C. A., Debode J., Vandecasteele B., D'Hose T., Cremilie P., Haegeman A., Ruttink T., Dawyndt P., Maes M. Biological, physicochemical and plant health responses in lettuce and strawberry in soil or peat amended with biochar. *Appl. Soil. Ecol.* 2016. V. 107. P.1–12.
135. De Vos M., Van Oosten V. R., Van Poecke R. M. P., Van Pelt J. A., Pozo M. J., Mueller M. J., Buchala A. J., Métraux J. P., Van Loon L. C., Dicke M., Pieterse C. M. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005. V. 18. P. 923–937.
136. Del Rio L. A., Lopez-Huertas E. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol.* 2016. V. 57. P.1364–1376.

137. Delaney T. P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E., Ryals J. Central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*. 1994. V. 26. P. 1247–1250.
138. Denoux C., Galletti R., Mammarella N., Gopalan S., Werck D., De Lorenzo G., Ferrari S., Ausubel F. M., Dewdney J. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol. Plant*. 2008. №1. P. 423–445.
139. Dewick P. M. Biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*. 1995. V. 12. P. 579–607.
140. Di Martino A., Sittlinger M., Risbud M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*. 2005. V. 26. P. 5983–5990.
141. Dighton J., White J. F. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem: Fourth Edition*. CRC Press, 2017. 619 p.
142. Ding L., Xu H., Yi H., Yang L., Kong Z., Zhang L., Xue S., Jia H., Ma Z. Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS ONE*. 2011. V. 6. I. 4. P. 1–17.
143. Dixon R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 2001. V. 411. P. 843–847.
144. Dixon R. A., Steele C. L. Flavonoids and isoflavonoids – a goldmine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci*. 1999. V. 4. P. 394–400.
145. Dixon R., Achnine L., Kota P., Liu C., Reddy M., Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 2002. V. 3 (5). P. 371–390.
146. Doares S., Syrovets T., Weiler E., Ryan C. Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 4095–4098.
147. Dodds P. N., Rathjen J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet*. 2010. V. 11. № 8. P. 539–548.

148. Domard A., Domard M., Chitosan: structure - properties relationship and biomedical applications. Polymeric biomaterials revised and expanded. Florida: CRC Press. P.187–212.
149. 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. V. 9. № 6. P. 1141–1144.
150. Durner J., Shah J., Klessig D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Sci. 1997. V. 2. P. 266–274.
151. Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-Ribose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95 (17). P. 10328–10333.
152. Durrant W. E., Dong X. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 2004. V. 42. P. 185–209.
153. Dutta P. K., Dutta J., Tripathi V. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. Journal of Scientific & Industrial Research. 2004. V. 63. P. 20–31.
154. Dzung N. A. Chitosan and their derivatives as prospective biosubstances for developing sustainable eco-agriculture. J. Chitin Chitosan. 2005. V. 10 (3). P. 109–113.
155. Edreva A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen Appl Plant Physiol. 2005. V. 31(1–2). P.105–124.
156. El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F. Chitosan in plant protection. Marine Drugs. 2010. V. 8 (4). P. 968–987.
157. Elad Y., Cytryn E., Harel Y. M., Lew B., Graber E. R. The biochar effect: plant resistance to biotic stresses. Phytopathol. Mediterr. 2011. V. 50. P. 335–349.
158. Ellis J. G., Dodds P. N., Lawrence G. J. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance–avirulence protein interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 2007. V. 45. P. 269–306.

159. El-Mohamedy R. S. R., Abdel-Kareem F., Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M. Chitosan and *Trichoderma harzianum* as fungicide alternatives for controlling fusarium crown and root rot of tomato. Tunisian Journal of Plant Protection. 2014. V. 9 (1). P. 31–44.
160. Erbacher P., Zou S., Bettinger T., Steffan A. M., Remy J. S. Chitosan-based vector DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. Pharm. Res. 1998. V. 15. P. 1332–1339.
161. Es-Safi N. E., Ghidouche S., Ducrot P. H. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. Molecules. 2007. V. 12. P. 2228–2258.,
162. Fontecave M., Lepoivre M., Elleingand E., Gerez C., Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. FEBS Lett. 1998. V. 421 (3). P. 277–279.
163. Forkmann G., Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. Curr Opin Biotechnol. 2001. V. 12. P. 155–160.
164. Fu L. J., Shi K., Gu M., Zhou Y. H., Dong D. K., Liang W. S., Song F. M., Yu J. Q. Systemic induction and role of mitochondrial alternative oxidase and nitric oxide in a compatible tomato tobacco mosaic virus interaction. Mol. Plant Microbe Interact. 2010. V. 23 (1). p.39–48.
165. Furusaki E., Ueno Y., Sakairi N., Nishi N., Tokura S. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. Carbohydrate Polymers. 1996. V. 9. P. 29–34.
166. Gang D. R., Kasahara H., Xia Z. Q., Vander Mijnsbrugge K., Bauw G., Boerjan W., Van Montagu M., Davin L. B., Lewis N. G. Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. J Biol Chem. 1999. V. 274 (11). P. 7516–27.
167. García-Garrido J., Ocampo J. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Journal of Experimental Botany. 2002. V. 53 (373). P.1377–1386.

168. Ghaderi N., Hormohammadi S., Javadi T. Morpho-physiological responses of strawberry (*Fragaria ananassa*) to exogenous salicylic acid application under drought stress. J. Agr. Sci. Technol. 2015. V. 17. P. 167–178.
169. Giri A. P., Harsulkar A., Patankar A., Gupta V., Sainani M., Deshpande V., Ranjekar P. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. Plant Pathol. 1998. V. 47. P. 693–699.
170. Golshani F., Fakheri B. A., Behshad E., Vashvaei R. M. PRs proteins and their mechanism in plants. Biological Forum. 2015. V. 7 (1). P. 477–495.
171. Golzar H., Phillips D., Mack S. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. Australasian Plant Disease Notes. 2007. V. 2. P. 145–147.
172. Gould K. S., Lister C. Flavonoid functions in plants. Chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, 2006. V. 8. P. 397–441.
173. Govrin E. M., Levine A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology. V. 10 № 13 P. 751–757.
174. Grantiņa-Leviņa L., Kalniņa I. Strawberry crown rot - a common problem in 2015. Environmental and Experimental Biology. 2016. V. 14. P. 51–52.
175. Grotewold E. The Science of flavonoids. New York: Springer Science, 2006. 273 p.
176. Guo H., Du Y., Bai X., Zhao X., Effects of active oxygen on suspended cotton cell culture by oligochitosan. Chin J Mar Drugs. 2003. V. 1. P. 11–12.
177. Gururani M. A., Venkatesh J., Upadhyaya C. P. Plant disease resistance genes: current status and future directions. Physiology and Molecular Plant Pathology. 2012. V. 78. P. 51–65.
178. Gutzeit H. O., Ludwig-Muller J. Plant natural products: synthesis, biological functions and practical applications. Wiley-Blackwell, 2014. 434 p.
179. Guzman J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. Molecules. 2014. V. 19 (12). P. 19292–19349.

180. Hadwiger L. A. Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype. *Plant Sci.* 2013. V. 208. P. 42–49.
181. Hammerschmidt R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* 1999. V.37. P. 285–306.
182. Harborne J. B. Biochemical plant ecology. *Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1997. P. 503–516.
183. Harborne J. B. Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep.* 2001. V. 18. P. 361–379.
184. Hassan O, Chang T. Chitosan for eco-friendly control of plant disease. *Asian Journal of Plant Pathology*. 2017. V. 11 (2). P. 53–70.
185. Havsteen B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therap.* 2002. V. 96. P. 67–202.
186. Hemantaranjan A., Katiyar D., Singh B., Nishant Bhanu A. A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. *Advances In Plants & Agriculture Research*. 2014. № 1. P. 1–8.
187. Hernandez-Lauzardo A. N., Bautista-Banos S., Velazquez-Del Valle M. G., Mendez-Moreno M. G., Sanchez-Rivera M. M., Bello-Perez L. A. Antigungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydr. Polym.* 2008. V. 73. P. 541–547.
188. Hernández-Lauzardo A., Velázquez-del Valle M., Guerra-Sánchez M. Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *African Journal of Microbiology Research*. 2011. V. 5 (25). P. 4243–4247.
189. Herrmann K., Weaver L. M. The shikimate pathway. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 1999. V. 50. P. 472–503.
190. Hongsanan S., Sanchez-Ramirez S., Crous P. W., Ariyawansa H. A., Zhao R. L., Hyde K. D. The evolution of fungal epiphytes. *Mycosphere*. 2016. V. 7 (11). P. 1690–1712.
191. Iakimova E. T., Michalczyk L., Woltering E. J. Hypersensitive cell death in plants: its mechanisms and role in plant defense against pathogens. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2005. V. 13. P. 135–158.

192. Inui H., Yamaguchi Y., Hirano S. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997. V. 61 (6). P. 975–978.
193. Jianglian D., Shaoying Z. Application of chitosan-based coating in fruits and vegetables preservation: a review. *Food Processing and Technology.* 2013. V. 4. P. 227–230.
194. Kabbaj M., Phillips N. C. Anticancer activity of mycobacterial DNA: effect of formulation as chitosan nanoparticles. *Journal of drug targeting.* 2001. V. 9. P. 317–328.
195. Karpova N. V., Shagdarova B. T., Lyalina T. S., Il'ina A. V., Tereshina V. M., Varlamov V. P. Influence of the main characteristics of low weight chitosan on the growth of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2019. V. 55 (4). P. 405–413.
196. Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P., Fritig B. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.* 1987. № 6 (11). P.3209–3212.
197. Khan W., Prithiviraj B., Smith D. L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J. Plant Physiol.* 2003. V. 160 (8). P. 859–863.
198. Khor E., Lim L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 2003. V 24. P. 2339–2349.
199. Kim I. Y., Seo S. J., Moon H. S., Yoo M. K., Park I. Y., Kim B. C., Cho C. S. Chitosan and its derivatives for tissue e engineering applications. *Biotechnol Adv.* 2008. V 26 (1). P. 1–21.
200. Kitajima S., Sato F. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *The Journal of Biochemistry.* 1999. V. 125. I. 1. P. 1–8.

201. Klarzynski O., Plesse B., Joubert J-M., Yvin J-C., Kopp M., Kloareg B., Fritig B. Linear β -1, 3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* V. 124 (3). P. 1027–1038.
202. Klaubauf S., Inselsbacher E., Zechmeister-Boltenstern S., Wanek W., Gottsberger R., Strauss J., Gorfer M. Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Divers.* 2010. V. 44. P. 65–75.
203. Klessig D. F., Malamy J. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 26. P. 1439–1458.
204. Korkina L. G., Afanas'ev I. B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv.Pharmacol.* 1997. V. 38. P. 151–163.
205. Kuc J. Induced immunity to plant disease. *Bioscience.* 1982. V. 32. P. 854–860.
206. Kuc J. Induced resistance in plants – molecular, environmental and practical implications. *IOBC/wprs Bulletin.* 2002. V. 25 (6). P. 1–8.
207. Kuc Y. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *J. Crop protection.* 2000. V. 19. P. 853–861.
208. Kumar A. B. V., Varadaraj M. C., Gowda L. R., Tharanathan R. N. Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 2005. V. 391. P. 167–175.
209. La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S., Hoffmann L., Fritig B., Legrand M., Heitz T. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews.* 2004. V. 198 (1). P. 267–284.
210. Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex R. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. *Salicylic Acid-A Plant Hormone.* Dordrecht: Springer. P. 15–23.
211. Lee C., Koo J., Park J. Antifungal effect of chitosan as Ca^{2+} channel blocker. *Plant Pathol J.* 2016. V. 32 (3). P. 242–250.

212. Legrand M., Kauffmann S., Geoffroy P., Fritig B. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceeding of National Academy of Sciences*. 1987. № 84. P. 6750–6754.
213. Leister D. Piecing the puzzle together: the central role of reactive oxygen species and redox hubs in chloroplast retrograde signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2019. V. 30 (9). 1206–1219.
214. Lim S. H., Hudson S. M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. Macromol. Sci.* 2003. V. 43. № 2. P. 223–269.
215. Limpanavech P., Chaiyasuta S., Vongpromek R., Pichyangkura R., Khunwasi C., Chadchawan S., Lotrakul P., Bunjongrat R., Chaidee A., Bangyeekhun T. Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. *Sci. Hortic.* 2008. V. 116 (1). P. 65–72.
216. Liu D., Jiao S., Cheng G., Li X., Pei Z., Pei Y., Yin H., Du Y. Identification of chitosan oligosaccharides binding proteins from the plasma membrane of wheat leaf cell. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. V. 111. P. 1083–1090.
217. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 95. P. 147–155.
218. Liu W., Sun S., Cao Z., Zhang X., Yao K., Lu W. W., Luk K. D. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*. 2005. V. 26. P. 2705–2711.
219. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method. *Methods*. 2001. V. 25 (4). P. 402–408.
220. Lopez-Moya F., Suarez-Fernandez M., Lopez-Llorca L.V. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *Int J Mol Sci*. 2019. V. 20 (2). P. 1–15.

221. Lucini L., Baccolo G., Rouphael Y., Colla G., Bavaresco L., Trevisan M. Chitosan treatment elicited defense mechanisms, pentacyclic triterpenoids and stilbene accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) bunches. *Phytochemistry*. 2018. V. 156. P. 1–8.

222. Ma P. L., Lavertu M., Winnik F. M., Buschmann M. D. Stability and binding affinity of DNA/chitosan complexes by polyanion competition. *Carbohydrate Polymers*. 2017. V. 176. P.167–176.

223. MacKenzie S. J., Mertely J., Peres N. *Colletotrichum fragariae* is a pathogen on host other than strawberry. *Plant Disease*. 2008. V. 92 (10). P. 1432–1438.

224. MacKenzie S., Legard D., Timmer L., Chandler C., Peres N. Resistance of strawberry cultivars to crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from florida is nonspecific. *Plant Dis*. 2006. V. 90 (8). P. 1091–1097.

225. Majeti N. V., Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*. 2000. V. 46 (1). P. 1–27.

226. Malamy J., Carr J. P., Klessing D. F., Raskin I. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*. 1990. V. 250. P. 1002–1004.

227. Manici L, Caputo F, Rossi A, Topp A, Zago M, Kelderer M. Thermal disturbance of fertile soils to search for new biological control options in strawberry crops affected by yield decline. *Biological Control*. 2018. V. 126. P. 65–73.

228. Mari Bhat M., Anusree M. E. Investigation of phylloplane mycoflora of some vegetable crops. *Asian J. Plant Sci. Res*. 2015. V. 5 (6). P. 63–68.

229. Mathesius U., Schlamann H. R. M., Spaink H. P., Sautter C., Rolfe B. C., Djordjevic M. A. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant Journal*. 1998. V. 14. P. 23–24.

230. Mazid M, Khan T. A., Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. 2011. V. 3 (2). P. 232–249.

231. McDonald C., Inohara N. Nuñez G. Peptidoglycan signalling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem.* 2005. V. 280. I. 21. P. 20177–20180.
232. Mera I. G. F., Falconí D. E. G., Córdova V. M. Secondary metabolites in plants: main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Bionatura.* 2019. V. 4. P. 1000–1009.
233. Metraux J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur. J. Plant Pathol.* 2001. V. 107. P. 13–18.
234. Métraux J-P., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz, M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W., Inverardi B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science.* 1990. V. 250 (4983). P. 1004–1006.
235. Miedes E, Vanholme R, Boerjan W, Molina A. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. (358). P. 1–13.
236. Mishina T. E., Zeier J. The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 1666–1675.
237. Mohiuddin A. K. Chemistry of secondary metabolites. *Annals of Clinical Toxicology.* 2019. V. 2. I. 1. P. 1–22.
238. Moilanen J., Salminen J-P. Ecologically neglected tannins and their biologically relevant activity: chemical structures of plant ellagitannins reveal their in vitro oxidative activity at high pH. *Chemoecology.* 2008. V. 18. P. 73–83.
239. Moilanen J., Sinkkonen J., Salminen J. Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods. *Chemoecology.* 2013. V. 23 (3). P. 165–179.
240. Morris K., Mackerness S. A. H., Page T., John C. F., Murphy A. M., Carr J. P., Buchanan-Wollaston V. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 2000. V. 23 (5). P. 677–685.

241. Mou Z., Fan W., Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. 2003. V. 113. P. 935–944.
242. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 1962. V. 15. P. 473–497.
243. Muriefah S. S. Effect of chitosan on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under water stress conditions. *Int Res JAgric Sci Soil Sci*. 2013. V. 3. P. 192–199.
244. Murphy A., Peer W. A., Taiz L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. 2000. V. 211. P. 315–324.
245. Naik, P., Al-Khayri, J. Abiotic and biotic elicitors—role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives*. 2016. P. 247–277.
246. Nayak B. K. Isolation and identification of phylloplane and endophytic fungi from one ornamental plant *Mangifera indica*. *Int.J. TechnoChem Res*. 2015. V. 1 (3). P. 188–192.
247. Nellist C. Disease resistance in polyploid strawberry. *Compendium of Plant Genomes*. 2018. P. 79–94.
248. Nguyen H. P., Chakravarthy S., Velásquez A. C., McLane H. L., Zeng L., Nakayashiki H. Methods to Study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2010. V. 23. P. 991–999.
249. O’Connell R. J., Panstruga R. Tėt á tėt inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytologist*. 2006. V. 171. № 4. P. 699–718.
250. Okinaka Y., Mimori K., Takeo K., Kitamura S., Takeuchi Y., Yamaoka N., Yoshikawa M. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol*. 1995. V. 109 (3). P. 839–845.

251. Park Y., Kim M-H., Park S-Ch., Cheong H., Jang M., Nah J-W., Hahm K-S. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *J Microbiol Biotechnol.* 2020. V. 18 (10). P. 1729–1734.
252. Pawlowska A. M., Oleszek W. Braca A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2008. V. 56. P. 3377–3380.
253. Peer W. A., Murphy A. S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. P. 556–563.
254. Pereira D. M., Valentão P., Pereira J. A., Andrade P. B. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules.* 2009. V. 14 (6). P. 2202–2211.
255. Pervaiz S. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug. Resis.* 2004. V. 7. P. 333–344.
256. Pieterse C. M. J., Van Loon L. C. The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. V. 7. P. 456–464.
257. Ploydee E., Chaiyanan S. Production of high viscosity chitosan from biologically purified chitin isolated by microbial fermentation and deproteinization. *Int. J. Polym. Sci.* 2014. V. 2014. P. 162–173.
258. Povero G., Loreti E., Pucciariello C. Transcript profiling of chitosan-treated *Arabidopsis* seedlings. *J. Plant Res.* 2011. V. 124. P. 107–118.
259. Prasad S., Ellis B. *In vivo* characterization of catechol ring-cleavage in cell cultures of *Glycine max*. *Phytochemistry.* 1978. V. 7 (2). P. 187–190.
260. Pratheesh Kumar P. M., Divya Bharathi H. B., Sivaprasad V. Antifungal effect of chitosan on certain soil borne fungal pathogens of Mulberry (*Morus* spp.). *IJSAR.* 2017. V. 4 (11). P. 4–11.
261. Raafat D., von Bergen K., Haas A., Sahl H-G., Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 3764–3773.
262. Rabea E. I., Badawy M. E., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol.* 2003. V. 4. № 6. P. 1457–1465.

263. Rahman M., Hjeljord L., Aam B., Sørli M., Tronsmo A. Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *Eur J Plant Pathol.* 2014. V. 141 (1). P. 147–158.
264. Ramakrishna A., Ravishankar G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior.* 2011. V. 6. P. 1720–1731.
265. Ramonell K. M., Zhang B., Ewing R. M., Chen Yu, Xu D., Stacey G., Somerville Sh. Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol.* 2002. V. 3. P. 301–311.
266. Rane K., Hoover D. Production of chitosan by fungi. *Food Biotechnology.* 1993. V. 7 (1). P.11–33.
267. Rasmussen J. B., Hammerschmidt R., Zook M. N. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology.* 1991. V. 97. P. 1342–1347.
268. Reymond P., Farmer E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998. V. 1. P. 404–411.
269. Rhoades J., Roller S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 80–86.
270. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science.* 2006. V. 31. № 7. P. 603–632.
271. Rivas-San Vicente M., Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. № 10. P. 3321–3338.
272. Robatzek S. Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cellular Microbiology.* 2007. V. 9. № 1. P. 1–8.
273. Roos W., Viehweger K., Dordschbal B., Schumann B., Evers S., Steighardt J., Schwartze W. Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways – the case of *Eschscholzia californica*. *Plant Physiol.* 2006. V. 163 (3). P. 369–381.

274. Roy K., Mao H. Q., Leong K. W. DNA chitosan nanospheres: transfection efficiency and cellular uptake. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1997. V. 24. P. 673–674.
275. Roze L. V., Chanda A., Linz J. E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology.* 2011. V. 48. P. 35–48.
276. Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H.-Y., Hunt M. D. Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 1996. V. 8. P. 1808–1819.
277. Salminen J.-P., Karonen M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology.* 2011. V. 25 (2). P. 325–338.
278. Salminen J.-P., Karonen M., Sinkkonen J. Chemical ecology of tannins: Recent developments in tannin chemistry reveal new structures and structure-activity patterns. *Chem. Eur. J.* 2011. V. 17. P. 2806–2816.
279. Schlösser E. Preformed phenols as resistance factors. *Acta Horticulturae.* 1994. V. 381. P. 615 – 630.
280. Schmid J., Amrhein N. The molecular organisation of the shikimate pathway in plants. *Phytochemistry.* 1995. V. 39. P. 739–747.
281. Sels J., Mathys J., De Coninck B. M., Cammue B. P., De Bolle M. F. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2008. V. 46 (11). P. 941–950.
282. Shafikova T. N., Omelichkina Yu. V. Molecular-genetic aspects of plant immunity to phytopathogenic bacteria and fungi. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2015. Vol. 62. № 5. P. 571–585.
283. Shang J., Xi D. H., Xu F., Wang S. D., Cao S., Xu M. Y., Zhao P. P., Wang J. H., Jia S. D., Zhang Z. W., Yuan S., Lin H. H. A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta.* 2011. V. 233 (2). P. 299–308.

284. Shanmugam A., Subhapradha N., Suman S., Ramasamy P., Saravanan R., Shanmugam V., Srinivasan A. Anticoagulant and antioxidant activity of sulfated chitosan from the shell of donacid clam *Donax scortum* (Linnaeus, 1758). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012. Vol. 4, № 2. P. 460–465.
285. Shulaev V., Leon J., Raskin I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Cell.* 1995. V. 7 (10). P. 1691–1701.
286. Simmons C. R. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -D-glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1994. №13. P. 325–387.
287. Singburaudom N., Piasai O., Dethaub T. Antimicrobial activity of different molecular weight chitosans to inhibit some important plant pathogenic fungi. *Kasetsart J (Nat Sci).* 2011. V. 45. P. 644–655.
288. Singleton V., Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphoungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965. V. 16. P. 144–158.
289. Somssich I., Hahlbrock K. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends In Plant Science.* 1998. V. 3 (3). P. 86–90.
290. Sticher L., Mauch-Mani B., M'etraux J.-P. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1997. V. 35. P. 235–270.
291. Stossel P., Magnolato D. Phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* induced by chemical treatment, microbial contamination and fungal infection. *Experientia.* 1983. V.39. № 2. P. 153–154.
292. Strand S. P., Danielsen S., Christensen B. E., Vårum K. M. Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules.* 2005. V. 6. P. 3357–3366.
293. 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. 2nd

International conference «Smart Bio». Kaunas, 03-05 May 2018: abstract. Kaunas, 2018. P. 308.

294. Subin O. V., Likhanov A. F., Sereda O. V., Klyuvadenko A. A., Melnuchyk M. D. Dynamics of phenolic compounds in leaves of *Fragaria ananassa* Duch. after treatment with different forms of chitosan. BioTechnologia. 2020. V. 101 (3). P. 227–237.

295. 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. Fiziol. Rast.genet. 2018. V. 50. № 2. P. 124–133.

296. Subin O., Melnychuk M., Likhanov A. Effect of different origin chitosan on the accumulation of phenolic antioxidants in *Fragaria ananassa* leaves. IV International scientific conference of young researches «Biotechnology: science I practice». Yerevan, 28-30 September, 2017: abstract. Yerevan, 2017. P. 35.

297. Sudhakar N., Nagendra-Prasad D., Mohan N., Murugesan K. Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against cucumber mosaic virus by using ozone. Journal of Virological Methods. 2007. V. 139 (1). P. 71–77.

298. Surico G. The concepts of plant pathogenicity, virulence/avirulence and effector proteins by a teacher of plant pathology. Phytopathologia Mediterranea. 2013. V.52 (3). P. 399–417.

299. Takahashi M., Shigeto J., Izumi Sh., Yoshizato K., Morikawa H. Nitration is exclusive to defense-related PR-1, PR-3 and PR-5 proteins in tobacco leaves. Plant Signaling & Behavior. 2016. V. 11 (7). P.1–5.

300. Taylor L. P., Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 317–323.

301. Teng W. L., Khor E., Tan T. K., Lim L. Y., Tan S. C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. Carbohydrate Research. 2001. V. 332 (3). P. 305–316.

302. Terakawa T., Takaya N., Horiuchi H., Koike M., Takagi M. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 1997. V. 16. P. 439–443.
303. Thakur A., Verma Sh., Reddy V., Sharma D. Hypersensitive responses in plants. *Agricultural Reviews.* 2019. P. 113–120.
304. Thakur M., Sohal B. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochemistry.* 2013. № 2013. P. 1–10.
305. Ton J., Van Pelt J. A., Van Loon L. C., Pieterse, C. M. J. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2002. V. 15. P. 27–34.
306. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 2005. № 7. P. 581–591.
307. Uknes S., Winter A. M., Delaney T., Vernooij B., Morse A., Friedrich L., Nye G., Potter S., Ward E., Ryals J. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Molec. Plant Microbe Interact.* 1993. V. 6. P. 692–698.
308. Upadhyaya L., Singh J., Agarwal V., Tewari R. P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 91. № 1. P. 452–466.
309. Vallad G. E., Goodman R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science Society of America.* 2004. V. 44. P. 1920–1934.
310. van Gendern, H. H., van Hemert J. Sites of flavone accumulation in some genotypes of *Silene praensis* (Rafn.) *Godron et Gren.* (Caryophyllaceae). *New Phytol.* 1986. V. 104. № 1. P. 33–39.
311. van Loon L. C. Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 1985. V. 4. P. 111–116.
312. van Loon L. C., Rep M., Pietersen C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135–162.

313. van Loon L., van Strien E. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological And Molecular Plant Pathology*. 1999. V. 55 (2). P. 85–97.

314. Vander P., Varum K. M., Domard A., El Gueddari N. E., Moerschbacher B. M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.* 1998. V. 118 (4). P.1353–1359.

315. Verlee A. Mincke S., Stevens C. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym.* 2017. V. 164. P. 268–283.

316. Verpoorte R., Memelink J. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002. V. 13. P. 181–187.

317. Vining L. C. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity: a review. *Gene*. 1992. V. 115. P. 135–140.

318. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 2010. V. 3 (1). P. 2–20.

319. Wang T-Y., Li Q., Bi K-Sh. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. V. 13. P. 12–23.

320. Wang Y., Lin H. H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 140–146.

321. War A. R., Paulraj M. G., War M. Y., Ignacimuthu S. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6 (11). P. 1787–1792.

322. Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual Review Of Plant Biology*. 2018. V. 69 (1). P.209–236.

323. Weisshaar B., Jenkins G. I. Phenylpropanoid metabolism and its regulation. *Curr. Opin. Pl. Biol.* 1998. V. 1. P. 251–257.

324. White S., Farina P., Fulton I. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. Appl. Environ. Microbiol. 1979. V. 38 (2). P.323–328.
325. Wiczowski W. Piskula M. K. Food flavonoids. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2004. V. 54 (1s). P. 101–114.
326. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 218–223.
327. Wu T., Li Y., Lee S. Chitosan-based composite hydrogels for biomedical applications. Macromolecular Research. 2017. V. 25. № 6. P. 480–488.
328. Wydro P., Krajewska B., Hac-Wydro K. Chitosan as a lipid binder: a langmuir monolayer study of chitosan–lipid interactions. Biomacromolecules. 2007. V. 8 (8). P.2611–2617.
329. Xing K., Zhu X., Peng X., Qin S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. Agron Sustain Dev. 2015. V. 35 (2). P. 569–588.
330. Xing R., Liu S., Guo Z., Yu H., Wang P., Li C., Li Z., Li P. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities *in vitro*. Bioorg. Med. Chem. 2005. V. 13. № 5. P. 1573–1577.
331. Xing Ti, Higgins V. J., Blumwald E. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. Plant Cell. 1997. V. 9 (2). P. 249–259.
332. Xu J. F., Zheng X. P., Liu W. D., Du R. F., Bi L. F., Zhang P. C. Flavonol glycosides and monoterpenoids from *Potentilla anserina*. J Asian Nat Prod Res. 2010. Vol. 12 (6). P. 529–534.
333. Yalpani N., Silverman P., Wilson T. M. A., Kleier D. A., Raskin I. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus infected tobacco. Plant Cell. 1991. V. 3. P. 809–818.
334. Yoshikawa M., Yamaoka N., Takeuchi Y. Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. Plant Cell Physiol. 1993. V. 34 (8). P. 1163–1173.

335. Yuan Y., Chesnutt B. M., Haggard W. O., Bumgardner J. D. Deacetylation of chitosan: material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*. 2011. V. 4. P. 1399–1410.
336. Zabka M., Pavela R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*. 2013. V. 93. P. 1051–1056.
337. Zakrzewska A., Boorsma A., Brul S., Hellingwerf K. J., Klis F. M. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukar. Cell*. 2005. V. 4 (4). P. 703–715.
338. Zhang S., Reddy M. S., Kokalis-Burelle N., Wells L. W., Nightengale S. P., Kloepper J. W. Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. *Plant Dis*. 2001. V. 85. P. 879–884.
339. Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol*. 2008. V. 20. № 1. P. 10–16.

ДОДАТКИ

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія

2. Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф., Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В., Спиридонов В. Г., Серeda 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., за ред. О. Л. Кляченко. Біополімерні комплекси та гетероциклічні сполуки в системі захисту рослин: монографія. Київ: ФОП Ямчинський, 2020. 227 с. *(Здобувачем взято участь у проведенні наукових досліджень, підготовці матеріалів до 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 НУБіП 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 (48). С. 26–33. *(Здобувачем проведено постановку експерименту, визначено кількість фенолів, флавоноїдів, пластидних пігментів, проведено біотест, 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. V. 50. № 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. V. 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. V. 101 (3). P. 227–237. (Здобувачем визначено фізико-хімічні властивості хітозанів, проведено постановку експерименту, підготовлено матеріали до друку).

Статті у 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.** Науково-методичні рекомендації "Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин". Київ, 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*. IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», м. Київ, 21–22 травня 2015: тези доповіді. Київ, 2015. С. 18. *(Здобувачем експериментально підібрано живильні середовища для мікроклонального розмноження суниці садової)*

12. **Субин А. В.**, Мельничук М. Д., Лиханов А. Ф., Спирочкина М. Н. Влияние салициловой кислоты на морфогенные процессы *Fragaria ananassa* Duch. в культуре *in vitro*. VIII Международная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», г. Минск, 28–30 октября 2015: тезисы доклада. Минск, 2015. С. 116. *(Здобувачем поставлено експеримент з дослідження впливу салицилової кислоти на морфогенні процеси суниці садової, підготовлено матеріал до друку)*

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

International scientific conference of young researches «Biotechnology: science I practice». 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).*

ПОГОДЖЕНО

Проректор з навчальної і виховної
роботи НУБіП України
академік НААН Кваша С. М.

«__» _____ 2021 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор НУБіП України

академік НААН Іоатулін І. І.



АКТ

**Про впровадження / використання результатів кандидатської
дисертаційної роботи у навчальний процес**

Основні положення висновки і пропозиції дисертаційної роботи здобувача кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України Субіна Олександра Володимировича на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 06.01.11. – фітопатологія, на тему: «Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) проти основних фітопатогенів» впроваджені у навчальний процес у вигляді підручника Біотехнологія та біоінженерія - 2017, навчального посібника «Основи біорізноманіття» - 2015 та науково-методичних рекомендацій «Науково-методичні рекомендації застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин» - 2019 та використовуються під час викладання дисциплін «Основи біорізноманіття» та «Інструментальні методи аналізу» для ОС «Бакалавр» спеціальності «162 - Біотехнології та біоінженерія» на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології, д.с-г.н, доцент

Коломієць Ю. В.

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття,
д.с-г.н., проф., чл.-кор. НААН

Патика М. В.

ЗАТВЕРДЖУЮ

ДП «Державний центр сертифікації і експертизи
сільськогосподарської продукції»
Ю. Б. Заставний
2021 р.



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи здобувача кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України Субіна Олександра Володимировича впроваджені у відділі фізико-хімічних лабораторних досліджень випробувальної лабораторії ДП «Державний центр сертифікації і експертизи сільськогосподарської продукції».

Вид впроваджуваних робіт: впроваджено методики визначення фізико-хімічних показників біополімерів, а саме: визначення ступеня деацетилювання титриметричним методом аналізу та визначення динамічної в'язкості та молекулярної маси біополімерів методом капілярної віскозиметрії. На основі впроваджених методик розроблено внутрішні методичні вказівки проведення досліджень.

Начальник випробувальної лабораторії

Н. О. Клюваденко

Начальник відділу фізико-хімічних
лабораторних досліджень

С. М. Ковриженко

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи здобувача кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України Субіна Олександра Володимировича «ІНДУКОВАНА СТІЙКІСТЬ СУНИЦІ САДОВОЇ (FRAGARIA ANANASSADUCH.) ПРОТИ ОСНОВНИХ ФІТОПАТОГЕНІВ» представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 06.01.11 «Фітопатологія» за науковим керівництвом д.б.н., професора, академіка НААН України М. Д. Мельничука були впроваджені у виробництво в ПСП АФ «Світанок», (Фастівський район, Київська область), у 2016-2018 рр.

В результаті запропонованої технології було впроваджено у виробництво технологію масової адаптації клонованого на безвірусній основі садивного матеріалу суниці садової українського високопродуктивного сорту «Аліна» на площі 3,0 гектари. Методом прямої адаптації до умов *ex vitro* з комплексним застосуванням системи біопрепаратів та крапельного зрошення на основі впроваджених результатів на базі ПСП АФ «Світанок» дозволила отримати якісні врожаї ягідної продукції підвищеної товарної якості із високоякісними органолептичними показниками та стійкістю проти основних фітопатогенів у порівнянні із класичними підходами по отриманню садивного матеріалу методом прямого живцювання.

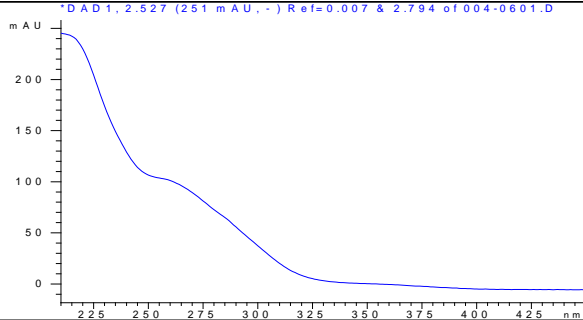
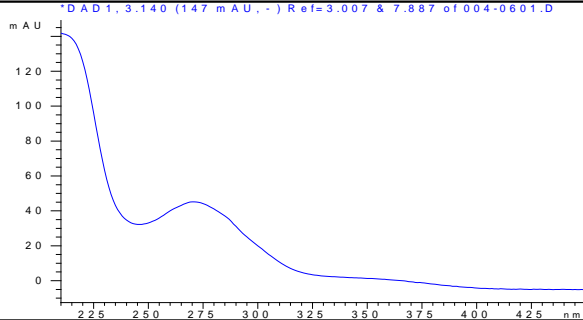
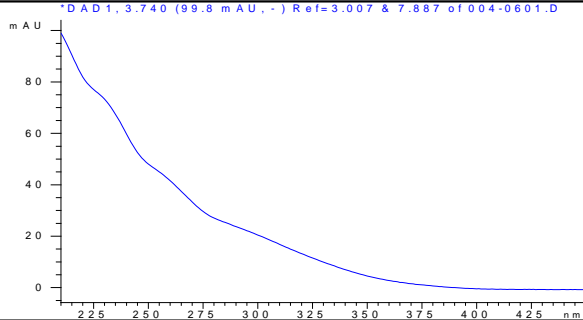
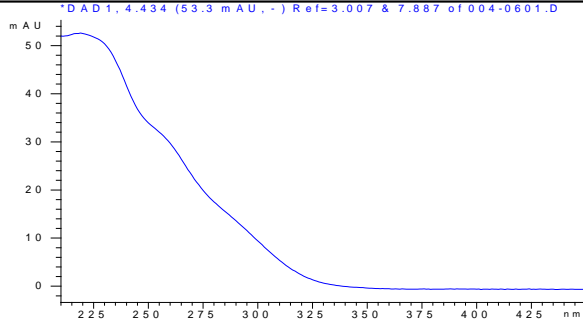
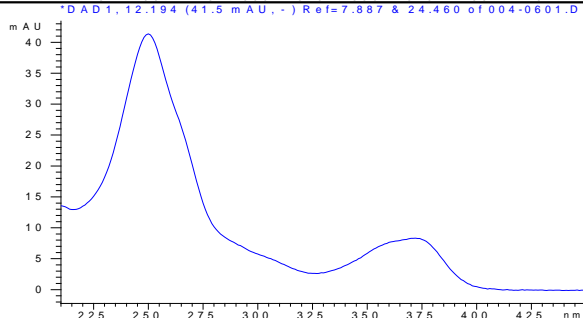
Отримані результати дозволяють стверджувати, що оздоровлений від фітопатогенів клонований *in vitro* садивний матеріал суниці садової сорту «Аліна» являється високоякісним і високопродуктивним для отримання ягідної біопродукції для прямого вживання, переробки та зберігання шляхом заморожування чи ліофілізації.

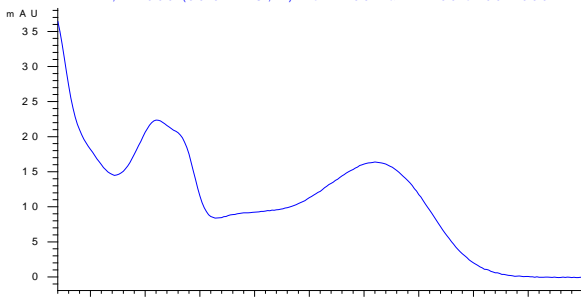
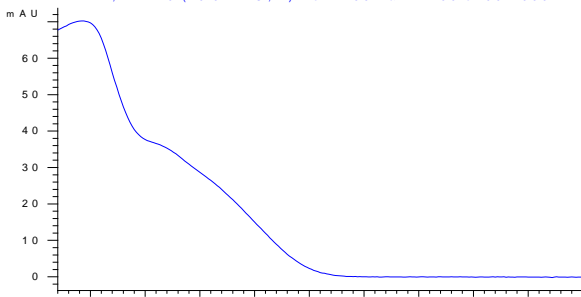
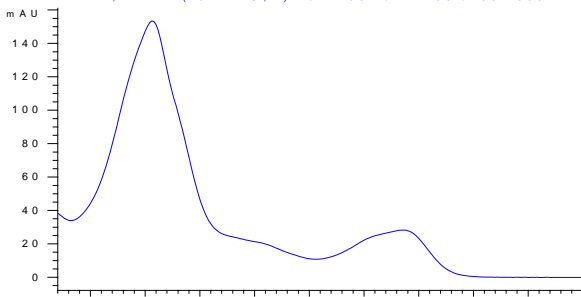
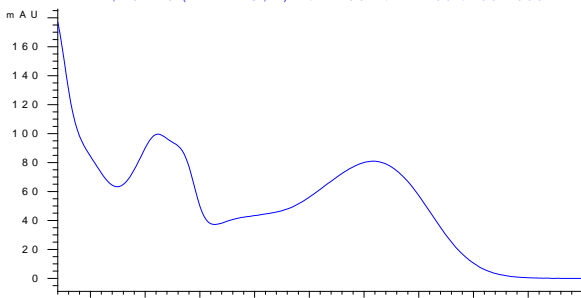
Директор ПСП АФ «Світанок»



Цаплієнко О.І.

УФ-спектри фенольних сполук суниці садової

№ піка	УФ-спектр
1	 <p>*D AD 1, 2.527 (251 mAU, -) Ref=0.007 & 2.794 of 004-0601.D</p>
2	 <p>*D AD 1, 3.140 (147 mAU, -) Ref=3.007 & 7.887 of 004-0601.D</p>
3	 <p>*D AD 1, 3.740 (99.8 mAU, -) Ref=3.007 & 7.887 of 004-0601.D</p>
4	 <p>*D AD 1, 4.434 (53.3 mAU, -) Ref=3.007 & 7.887 of 004-0601.D</p>
5	 <p>*D AD 1, 12.194 (41.5 mAU, -) Ref=7.887 & 24.460 of 004-0601.D</p>

№ піка	УФ-спектр	
6		<p>*DAD1, 12.500 (36.6 mAU, -) Ref=7.887 & 24.460 of 004-0601.D</p> 
7		<p>*DAD1, 14.220 (70.5 mAU, -) Ref=7.887 & 24.460 of 004-0601.D</p> 
8		<p>*DAD1, 14.474 (154 mAU, -) Ref=7.887 & 24.460 of 004-0601.D</p> 
9		<p>*DAD1, 15.220 (177 mAU, -) Ref=7.887 & 24.460 of 004-0601.D</p> 
10		<p>*DAD1, 24.634 (23.3 mAU, -) Ref=24.460 & 31.994 of 004-0601.D</p> 