

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені В. Н. КАРАЗІНА
Біологічний факультет
Кафедра фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

**СКЛАД МІКРОФЛОРИ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ
ЗА РОЗВИТКУ В УМОВАХ ТЕРМОСТРЕСУ**

Допущена до захисту

«__» _____ 2023 р

Завідувач кафедри _____

Оцінка «_____»

Голова АК _____

«__» _____ 2023 р

Кваліфікаційна робота
студентки 2 курсу денної
форми навчання
другого (магістерського)
рівня вищої освіти
Курнікової Владислави
Віталіївни

Науковий керівник:
доцент ЗВО Віннікова О. І.
Науковий консультант:
викладач ЗВО Раєвська І. М.

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

Робота викладена на 61 сторінці друкованого тексту, містить 3 таблиці, 14 рисунків, 69 посилань на джерела інформації.

Вивчали вплив високих та низької температур на проростання насіння, ростові показники проростків, активність амілази у сім'ядолях та визначали вплив термостресу на активність і чисельність ендофітної мікрофлори насіння колекційних сортів гороху посівного (*Pisum sativum* L.).

Встановлено, що високі температури пригнічували процеси проростання насіння досліджуваних сортів гороху. Показано, що висока температура в різній мірі пригнічувала розвиток надземної та підземної частин проростків. Депресія ростових процесів надземної частини проростків гороху була вищою, у порівнянні з показниками для підземної частини. За низької температури відбувалася стимуляція проростання насіння гороху посівного, проте мало місце гальмування ростових процесів проростків. Депресія ростових процесів підземної частини проростків була вищою, у порівнянні з аналогічними показниками для надземної частини проростків. Високі і низька температури пригнічували активність амілази у сім'ядолях гороху посівного, виявлено, що протягом перших 5 діб проростання ефект пригнічення посилюється. Насіння досліджуваних сортів гороху посівного різнилося за показниками загальної чисельності мікроорганізмів та їх активністю. Проте, істотної залежності активності мікробіому насіння досліджуваних сортів гороху від дії термостресу виявлено не було.

Ключові слова: термострес, насіння гороху посівного, *Pisum sativum* L., ростові процеси, активність амілази, ендофітна мікрофлора.

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1. Огляд літератури.....	6
1.1. Роль мікроорганізмів у процесах росту і розвитку бобових рослин	6
1.2. Термострес і його вплив на рослини та ґрунтові мікроорганізми ..	12
1.2.1. Термострес та механізми адаптації рослин до температурного стресу.....	14
1.2.2. Термострес та механізми адаптації мікроорганізмів до температурного стресу.....	20
2. Матеріали і методи дослідження	26
3. Результати дослідження та обговорення.....	31
3.1. Вивчення термостійкості проростків гороху посівного.....	32
3.2. Вивчення ендофітної мікрофлори насіння гороху посівного.....	46
Висновки.....	52
Література.....	53

ВСТУП

Територія України охоплює різноманітні ґрунтово-кліматичні зони, що характеризуються недостатньою або надлишковою кількістю опадів, низькими зимовими або високими літніми температурами, тощо [13]. За цих умов продуктивність рослин визначається стійкістю до несприятливих факторів середовища. Низькі позитивні температури зумовлюють зниження врожайності рослин, погіршення якості продукції та збільшення тривалості вегетаційного періоду. Жаростійкість значною мірою визначається фазою росту і розвитку рослин. Високі температури завдають найбільшої шкоди рослинам на ранніх стадіях їх розвитку, оскільки молоді тканини, що активно ростуть, менш стійкі, ніж старі. Стійкість до тепла в різних органів рослин неоднакова: менш стійкі підземні органи, більш стійкі пагони і бруньки [13]. Тому важливо проводити оцінку насіння на стійкість до холоду (низькі позитивні температури), до високих температур, що є важливим завданням селекційної роботи. Процес симбіотичної фіксації азоту у рослин є особливо чутливим до змін довкілля, незалежно від того, чи є ці впливи позитивними чи негативними, вони впливають на ключові життєві процеси рослини [3].

Підвищення температури, викликані поточними змінами клімату, є основною причиною зниження врожайності бобових. Горох (*Pisum sativum* L.) є важливою однорічною бобовою культурою, що вирощується в регіонах з помірним кліматом [45]. Актуальність вивчення впливу термостресу на бобові рослини зазначається в контексті зростаючих загроз природним і агроєкосистемам, водним ресурсам та збільшення емісії парникових газів у зв'язку з глобальними та регіональними змінами клімату.

Ці зміни призводять до ускладнення завдань забезпечення людства продовольчими, енергетичними, лікарськими та кормовими ресурсами. Це вимагає змін у раціоні людини, але залишає актуальною проблему знаходження

альтернативних джерел рослинної продукції для повноцінного харчування. Бобові культури, зокрема, стають важливою альтернативою, забезпечуючи людство білком, молочною продукцією та олією. За даними бази даних FAO, упродовж останніх 30 років спостерігається щорічне збільшення виробництва зеленого гороху по всьому світу. Проте, врожайність в різних країнах залишається нестабільною та варіюється. Ця нестабільність вирощування гороху може бути пов'язана з різними факторами, такими як кліматичні умови та сільськогосподарські практики в окремих країнах [23].

Виходячи з вищенаведеної інформації та з результатів досліджень, проведених у сфері ботаніки, агрономії, фізіології і біохімії рослин і мікроорганізмів, метою роботи було визначення впливу високих та низької температур на окремі фізіолого-біохімічні властивості та ендоефітну бактеріофлору колекційних сортів гороху посівного (*P. sativum* L.).

Для досягнення мети були поставлені та вирішені такі задачі:

- визначити ефект короткотривалого впливу високих і низької температур на показники енергії проростання, лабораторну схожість насіння та визначити депресію ростових процесів проростків досліджених сортів гороху посівного;
- визначити активність амілази у сім'ядолях насіння досліджених сортів гороху посівного;
- дослідити чисельність і активність ендоефітної мікрофлори насіння за умов короткотривалої дії позитивної низької та високих температур.

Тож, зі зростаючою зміною кліматичних умов та важливістю гороху як важливої культурної рослини у сільському господарстві, вивчення його мікробіоти в умовах стресу стає актуальним завданням.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль мікроорганізмів у процесах росту і розвитку бобових рослин

Фітосфера є важливою екологічною нішею, де відбувається взаємодія між рослинами та мікроорганізмами. Мікроорганізми, що взаємодіють з рослинами, все частіше розглядаються як активні агенти, що сприяють стимулюванню росту та розвитку рослин [58]. Ці мікроорганізми активно впливають на процеси їхнього росту та розвитку. Вони сприяють формуванню відповіді рослин на біотичні та абіотичні стресори. Мікроорганізми фітосфери впливають на біологічні процеси у рослини безпосередньо та опосередковано, здійснюючи біомобілізацію мінералів у ґрунті, супресію фітопатогенів і стресових умов, вироблення фітогормонів, забезпечуючи їм необхідні поживні речовини та сприяючи розвитку системної резистентності до хвороб, формуванню сильних і здорових рослин [40].

Дослідження симбіотичної азотфіксації розкрили сигнали, що регулюють специфіку взаємодії між мікроорганізмами та рослинами. Арбускулярні мікоризні гриби і ризобактерії відіграють важливу роль як мікробні ендосимбіонти, забезпечуючи бобові рослини необхідними поживними речовинами, такими як фосфор і азот, на ґрунтах з дефіцитом цих речовин. У цій симбіотичній взаємодії бобові рослини надають вуглець мікробним симбіонтам в обмін на фосфор та азот, утворюючи трохи сторонню симбіотичну асоціацію (бобові–мікоризні гриби–ризобактерії) [5, 66]. Ця взаємодія залежить від складних обмінів вуглецю на фосфор і вуглецю на азот, що має позитивний вплив на ріст бобових рослин.

Серед усіх мікроорганізмів, що колонізують фітосферу, бактерії групи PGPR (ріст-стимулюючі бактерії, що сприяють росту рослин) є найбільш детально дослідженими. Їх вважають потенційними ендofітами, які можуть подолати ендодермальний бар'єр. Ці бактерії переважно проникають у рослину

через кореневий кортекс, займають судинну систему та утворюють ендofітні популяції у корені, стеблі, листках та інших органах [33, 41]. Вільно існуючі ризобактерії та ендofітні бактерії, що займають різні екологічні ніші, відзначаються спільними механізмами стимуляції росту та захисту рослин від фітопатогенів. Ці бактерії взаємодіють з рослинами за допомогою різних механізмів, які сприяють покращенню їхнього росту та виживання в різних умовах [31].

Пряме стимулювання росту і розвитку рослин включає покращення їхнього мінерального живлення шляхом забезпечення необхідними поживними речовинами. Наприклад, бактерії можуть фіксувати азот з атмосфери та конвертувати його в доступну форму для рослин, що підвищує їхню виживаємість та продуктивність. Процеси азотфіксації в ґрунтах пов'язані з амоніфікацією, що є ферментативним розщепленням азотовмісних речовин. Отже, до складу мікробних ценозів ґрунтів входять не лише азотфіксуючі мікроорганізми, але й бактерії, що розщеплюють азотвмісні органічні речовини. Під час цього процесу утворюється аміак, який стає субстратом для інших груп мікроорганізмів, зокрема, нітрифікатори. Амоній та інші азотвмісні сполуки можуть бути окислені значною кількістю гетеротрофних мікроорганізмів. У цьому процесі автотрофні бактерії родів *Nitrosomonas* і *Nitrobacter* відіграють ключову роль. Під час нітрифікації утворюється нітрат, який накопичується в ґрунті. Частково цей нітрат може бути спожитий рослинами після його відновлення до іонів амонію, що сприяє їхньому зростанню [12]. Мікроорганізми у ґрунті, такі як бактерії та гриби, відіграють ключову роль у мобілізації фосфору, перетворюючи його з недоступних сполук на форми, які можуть засвоюватися рослинами. Ризосферні мікроорганізми беруть активну участь у цьому процесі, що сприяє збільшенню доступності фосфору для рослин [5, 66].

Гумус, або перегній, є органічною складовою ґрунту, яка формується під впливом мікробіологічних процесів, що перетворюють рештки рослин і тварин на гумусові речовини. Кількість гумусу в ґрунті є ключовим фактором його плодючості. Приблизно 80-90% органічних решток у ґрунті піддаються мінералізації, тоді як лише 10-20% відіграють роль у формуванні гумусу [12]. Важливою функцією ґрунтових мікроорганізмів, зокрема бактерій групи RGPB, є процес мінералізації гумусу. Цей процес полягає у вивільненні мінеральних елементів зі складних нерозчинних сполук гумусу. Мінералізація активізує живлення рослин і сприяє переробці органічних речовин. Ґрунтові мікроорганізми, включаючи бактерії RGPB, беруть участь у всіх етапах утворення гумусу, починаючи з розкладання свіжого рослинного матеріалу і закінчуючи формуванням простих гумусових сполук і їхнім подальшим ускладненням. Ці мікроорганізми відіграють важливу роль у процесах розкладання та оновлення гумусу в ґрунті [12, 15].

Також важливими у процесах росту і розвитку рослин є продукти життєдіяльності мікроорганізмів, наприклад, антибіотики, амінокислоти, вітаміни, ферменти, гормони та інші речовини, вони мають властивості хелатування. Мікроорганізми здатні зв'язувати метали – залізо, мідь, цинк, марганець, кальцій, кобальт, молібден та інші, що підвищує доступність цих елементів для рослин. Ці хелати, коли потрапляють до рослини, концентруються у листках та інших органах рослини, дозволяючи їй забезпечуватися необхідними металами, які інакше не могли бути засвоєні з розчину. Ці хелати виробляються мікроорганізмами і включають антимікробні речовини, такі як сидерофори, наприклад, ферохром, ферикроцин, ферихризин, ферирубін, альбоміцин тощо. Інші мікробні метаболіти, які хелатизують метали та мають у своєму складі іони заліза, відомі як фероксаміни, такі як терилен-фактор, фактори А, В, С, D, Е, Р. Ці процеси сприяють підвищенню доступності металів для рослин та покращують їх живлення [21, 22, 51, 69].

Також відомо [41], що мікроорганізми різних таксономічних груп синтезують фітогормони ауксинової, гіберелінової й цитокінінової природи. Вивчено, що епіфітні рослини виробляють ауксини та цитокініни. Низька концентрація цих речовин сприяє ефективній колонізації рослинами різних поверхонь, таких як листя, епіфітні фітопатогени. Бактерії *Methylobacterium spp.*, які виробляють цитокініни, успішно використовуються при вирощуванні сої в умовах зрошення, що значно підвищує врожайність [35]. Дослідження, яке включало в себе аналіз колекції бактерій роду *Pseudomonas*, показало, що ці бактерії виробляють речовини, які сприяють росту рослин. Певні штами цих бактерій, які зустрічаються у ризосфері, виробляють індоліл-3-оцтову кислоту (ІОК) та цитокініни [1]. В культурах бульбочкових бактерій було виявлено наявність цитокінінів та гібереліноподібних сполук [1]. Суспензії бактерій *Methylobacterium spp.*, що синтезує цитокініни, з успіхом застосовують при вирощуванні сої в умовах зрошення, що суттєво збільшує врожайність [47]. Бактерії з групи RGPB, які сприяють росту рослин, виробляють різні хімічно активні сполуки, що впливають на процеси розвитку та дихання рослин, а також накопичення фітомаси. Дослідження показують, що речовини з ауксиновою та цитокініновою активністю стимулюють фази світлової та темної фотосинтезу, активізують обмін речовин, що впливає на продуктивність рослин. [1, 15].

Ендofітні бактерії рослин також виявляють активність АЦК-дезамінази, що призводить до розпаду попередників етилену і зниження рівня вироблення цього гормону рослинами. Деякі бактерії виробляють ІОК, яка активує АЦК-синтазу, що збільшує концентрацію етилену. Але присутність активної АЦК-дезамінази заважає накопиченню попередників етилену, запобігаючи підвищенню рівня етилену до того рівня, за якого сповільнюється ріст рослини [29, 37].

Непряме стимулювання росту і розвитку рослин полягає в зниженні впливу на них фітопатогенів. Це може бути результатом конкуренції за ресурси

чи продукції антимікробних сполук, які запобігають росту патогенних мікроорганізмів у кореновому середовищі [31]. Мікроорганізми, зокрема бактерії групи RGPB, синтезують низькомолекулярні залізов'язувальні білки – сидерофори, що утворюють стабільні комплекси з іонами тривалентного заліза. Це допомагає забезпечити доступ рослинам до заліза навіть за недостатньої кількості цього елемента в ризосфері. Дана взаємодія забезпечує виживання рослин навіть за умов обмеженості залізом у навколишньому середовищі, роблячи їх більш стійкими до таких стресових умов [50]. Сидерофори, що продукують бактерії групи PGPR, відіграють ключову роль у їхніх антагоністичних взаємодіях з ризосферними псевдомонадами та ґрунтовими фітопатогенами. Ці сполуки допомагають оптимізувати процеси живлення рослин, запобігаючи їхньому виснаженню залізом у ґрунті. Завдяки мікроорганізмам, рослини можуть існувати за низької концентрації доступного заліза у ґрунті [47]. Умови з низькою концентрацією заліза у ризосфері сприяють виробництву сидерофорів бактеріями групи RGPB, які виявляють більшу активність у порівнянні з грибовими сидерофорами. Грибкові сидерофори мають меншу спрямованість до заліза, що призводить до пригнічення росту фітопатогенних грибів [46, 52]. Окремі штами бактерій групи RGPB продукують сидерофори, що вилучають залізо з хелатних сполук бактерій із меншою спорідненістю до заліза. Антагоністичний вплив бактерій групи PGPR на фітопатогени проявляється особливо ефективно в умовах низької концентрації металу у ґрунті. Проте захисний ефект сидерофорів, які виробляють ці бактерії, різко знижується в кислих ґрунтах, де розчинність та доступність заліза значно зростають [52, 56]. Бактерії-ендофіти продукують сидерофори, що можуть взаємодіяти залізом та іншими металами. Вони є мультирезистентними та стійкими до забруднювачів, порівняно з бактеріями ризосфери [37].

Антибіотики, що синтезуються бактеріями групи RGPB, мають великий потенціал у гальмуванні росту патогенних мікроорганізмів. Ці антибіотики включають амфісин, 2,4-діацетилфлороглуцинол (DAPG), гідроген ціанід, ооміцин А, феназин, піолутероїн, піролнітрин, тенсин, трополон та циклічні ліпопептиди [24]. Мікроорганізми також можуть інактивувати токсини патогенних мікроорганізмів та пригнічувати ріст мікробних антагоністів. Крім того, бактерії групи RGPB можуть сприяти деградації аутоіндукованих молекул-сигналізаторів та блокувати експресію генів вірулентності. Мікроорганізми також можуть допомагати утилізувати токсичні сполуки, що забезпечує кращі умови для росту рослини. Після поглинання токсин метаболізується або виділяється в атмосферу через випаровування [22]. Процеси детоксикації різних сполук активно вивчаються у мікробах, які асоційовані з ризосферою, філосферою та ендосферою рослин.

Бактерії групи RGPB можуть індукувати системну резистентність у рослин до широкого спектру патогенів, сприяючи захисним механізмам рослин проти хвороб. Цей процес, відомий як індукована системна резистентність (ISR), подібний до системної набутої резистентності (SAR), але не викликає фенотипних змін у рослинах. Цей вид резистентності розвивається завдяки активації захисних механізмів рослини після попередньої патогенної інфекції. ISR є ефективною проти багатьох патогенів і залежить від взаємодії рослини з конкретними штамми бактерій. Інтенсивність прояву SAR залежить від характеру взаємодії між рослиною-живителем й штамом бактерії [67]. У більшості випадків індукована системна резистентність (ISR) спостерігається через взаємодію рослин із вільно існуючими ризобактеріями групи PGPR. Оскільки на даний момент інформація про механізми антагонізму в ризосфері є обмеженою, і більшість цих механізмів залишаються невизначеними, їх часто відносять до явища індукованої системної резистентності (ISR). Так, ризобактерії *P. fluorescens* 63-28 ефективні проти гриба *Pythium ultimum* і *F.*

oxysporum f. sp. pisi, що паразитують на корені гороху, а ризобактерія *Bacillus pumilus* SE34 є антагоністом *F. oxysporum f. sp. pisi*, який є фітопатогеном гороху [20, 42]. Біопротекторні властивості бактерій групи PGPB пов'язані зі синтезом флагелів, сидерофорів і ліпополісахаридів. Але вони не є сигналами для формування ISR. Ключовою ролью в індукції ISR відіграють леткі органічні сполуки, такі як жасмонова кислота та етилен. Також встановлено, що сигнальною сполукою, що викликає набуття ISR, є саліцилова кислота, яка синтезується окремими бактеріями групи PGPB і потрапляє в ризосферу. Індукована ризобактеріями ISR супроводжується зміцненням клітинної стінки, змінами в фізіологічних процесах та синтезом захисних метаболітів, що спрямовані проти патогенів [23, 34, 46, 54, 55, 57, 67].

1.2. Термострес і його вплив на рослини та ґрунтові мікроорганізми

Термострес – це негативний вплив зміни температурного режиму на рослини та ґрунтові мікроорганізми. Цей фактор може призвести до серйозних наслідків для екосистеми. Наприклад [7], високі температури можуть спричинити пошкодження клітинних мембран рослин, втрату води через транспірацію та зниження фотосинтезу, може впливати на гідрататорну стабільність рослин та денатурації ферментів, що може порушити багато біохімічних процесів у клітинах рослин. Це може призвести до зниження врожаю та погіршення якості рослинництва. Крім того, термострес може вплинути на склад та активність мікроорганізмів у ґрунті. Деякі мікроорганізми можуть виявити витривалість до високих температур, тоді як інші можуть вмирати або ставати менш активними. Це може призвести до змін у процесах розкладання органічних решток та гумусоутворення в ґрунті, що може вплинути на його родючість [4].

Головні складові мікробіоти ґрунту – бактерії та гриби – мають важливу функцію у підтримці здоров'я та плодючості ґрунту. Відомо, що бактерії та

гриби, які мешкають у кореновому мікробіомі, можуть мати взаємовідносини із рослинами у вигляді симбіозу, патогенезу чи корисної співпраці, а також взаємодії між собою. Мікробіота ґрунту грає важливу роль у біогеохімічних циклах, таких як азотний, вуглецевий, сірковий та фосфорний. Наприклад, *Rhizobium sp.* симбіотично фіксують азот у бобових рослин, отримуючи взаємін фіксований вуглець і цукор. Бактерії *Azotobacter* вільно мешкають у ґрунті і є організмами, що здатні фіксувати азот. У циклі вуглецю обов'язкові симбіонти, такі як *Proteobacteria* і AMF, отримують вуглець від рослин-господарів, а також ектомікоризні гриби (ECM), які можуть мінералізувати органічний вуглець. У сірковому циклі анаеробні сульфідокислюючі пурпурні та зелені бактерії, а також деякі аноксигенні ціанобактерії, можуть виробляти елементарну сірку та сульфат. AMF сприяють поглибленню сірки у ґрунті [27]. У лужному ґрунті фосфор перетворюється на легко засвоювану форму за допомогою мікроорганізмів, які розчиняють фосфати (PSM). Ці мікроорганізми включають різні штами бактерій, таких як *Rhizobium*, *Pseudomonas* і *Bacillus*, а також гриби родів *Aspergillus* і *Penicillium*, AMF і актиноміцети. [40] Крім того, мікробіота ґрунту бере участь у виробництві антибіотиків для захисту від патогенів, розкладанні органічної біомаси, біодеградації, підтримці структури ґрунту, поглибленні поглибленні та підтримці рівноваги поживних речовин, а також забезпеченні стійкості до стресу в ґрунті [38].

Рослини встановлюють різноманітні взаємодії з ґрунтовими мікроорганізмами, які можуть варіювати від мутуалістичних та коменсальних до експлуатаційних чи конкурентних. Мутуалістичні мікроорганізми, присутні у мікробних спільнотах, пов'язаних з рослинами, сприяють росту рослин різними способами. Багато досліджень свідчать про те, що мікробіом ґрунту може надавати суттєві переваги рослинам-господарям. Однак умови ґрунту, такі як рН, температура, кисень, фізико-хімічні параметри та вологість, разом із характеристиками ґрунтового середовища, наприклад, посушливість, занурення,

токсичність металів і солоність, а також типи або генотипи рослин і сільськогосподарські методи можуть призводити до відмінного складу мікроорганізмів та їхніх характеристик. Ці фактори також впливають на механізми, за якими мікроорганізми сприяють розвитку рослин і захищають їх від стресових впливів [16]. Термічний стрес впливає на ґрунтові мікроорганізми, змінюючи структуру та функціональність їхніх мікробіоценозів. Підвищені температури можуть викликати втрату біорізноманіття та активності мікроорганізмів у ґрунті. Деякі види можуть адаптуватися до екстремальних температур, тоді як інші можуть відчувати негативний вплив або навіть загинути. Ці зміни можуть значно вплинути на екосистемні процеси, такі як розкладання органічних речовин, нітрифікація, фіксація азоту та інші біохімічні процеси, що залежать від активності ґрунтових мікроорганізмів. Тим не менше, деякі мікроорганізми можуть розвивати стратегії адаптації, такі як синтез білків теплового шоку та інших захисних механізмів, що сприяють їх виживанню під впливом термостресу [16].

Ґрунтові мікроорганізми, що асоціюються з рослинами у ризосфері, відіграють ключову роль у рості та метаболізмі рослин. Вони активно розкладають органічні речовини, мінералізують та надають поживні речовини для рослин у ґрунті, підтримуючи екосистему ґрунту та біогеохімічний цикл. Ці мікроорганізми взаємодіють між собою та з рослинами у ризосфері, зіштовхуючись із різноманітними стресами, що можуть бути біотичного та абіотичного характеру. Різноманіття цих мікроорганізмів та їх вплив на родючість ґрунту важливе для зростання та розвитку рослин [16].

1.2.1. Термострес та механізми адаптації рослин до температурного стресу

Стійкість рослин до низьких та високих температур можна розділити на дві основні категорії: стійкість (витривалість, толерантність), яка виражається у здатності цитоплазми витримувати вплив надзвичайно високих або низьких

температур через її фізико-хімічні властивості, та уникнення, яке включає наявність у рослини механізмів і пристосувань, які запобігають пошкодженню від крайніх температур. Проте, такі пристосування є відносно рідкісними й часто короткочасними. Пошкодження від холоду супроводжується втратою тургору листя та змінами забарвлення через руйнування хлорофілу. Головна причина загибелі рослин від низьких позитивних температур полягає в порушенні обміну речовин, коли процеси розпаду переважають над процесами синтезу, внаслідок чого накопичуються отруйні речовини та порушується структура цитоплазми [4].

Живі організми поділяються на кріофілів, що витримують холод, та термофілів, що адаптовані до високих температур. Кріофіли активні при низьких температурах і поширені в холодних регіонах, тоді як термофіли зазвичай зустрічаються у тропіках. Рослини, наприклад, можуть виживати при температурі $+70^{\circ}\text{C}$. Фотосинтез різних рослин залежить від температур: вона може зменшуватися від впливу холоду на ферменти або негативно впливати на органели. Мінімальна температура для фотосинтезу середньою смугою становить близько 0°C , для тропічних рослин – $+5-10^{\circ}\text{C}$. Деякі гірські рослини можуть фотосинтезувати при температурі нижче 0°C . Оптимальна температура фотосинтезу для більшості рослин середньої смуги зазвичай коливається від $+20^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$ [4].

За впливу високої температури в клітинних мембранах відбуваються значні зміни. Збільшується кількість ненасичених фосфоліпідів, що знижує взаємодію між полярними групами білків та ліпідною фазою мембрани. Це призводить до змін у структурі та складі мембран, підвищення їхньої проникності та виділення водорозчинних речовин з клітини. Ферменти можуть втратити активність, що впливає на енергозалежні процеси [7]. Висока температура також збільшує в'язкість цитоплазми та гальмує рух цитоплазми, що впливає на транспорт води, та розкладання основних полімерів, стає більш

вираженим. Фотосинтез та фіксація вуглекислоти сповільнюються, а транспорт електронів в фотосистемі II стає найбільш чутливим до високої температури. Деякі ферменти фотосинтезу можуть денатурувати, порушуючи цілісність мембран та процеси енергозалежних реакцій. Також за впливу високої температури активізується дихання, зокрема альтернативний шлях дихання, де енергія окислення розсіюється у вигляді тепла. Мікросомальне окислення та перекисне окислення ліпідів також збільшуються, що може призвести до надмірного витрачання субстратів та руйнування мембран. Ці зміни можуть вплинути на різні функції організму, такі як фотосинтез, дихання та розмноження, що може призвести до недорозвинення насіння та втрати стійкості до стресу в рослин [10].

Більшість клітинних механізмів стійкості сформувалися на початкових стадіях еволюції, що призводить до загальної основи захисних систем у вищих рослин і менш розвинених організмів. Зміни в метаболізмі, фізіологічних функціях та ростових процесах під час стресів пов'язані з експресією генів. Коли рослина розпізнає стресор на клітинному рівні, відбувається активація шляхів передачі сигналу. Ці сигнали впливають на геном, індукуючи чи пригнічуючи синтез різних білків. Експресія генів, що відбувається у відповідь на стресор, інтегрується у відповідь всієї рослини, призводячи до зупинення росту та збільшення стійкості до стресора. При зміні обміну речовин під час стресу використовуються резервні можливості організму, що координується за допомогою систем регуляції. Умови життя клітини в нормальних і стресових умовах потребують комплексної регуляції, яка включає генетичні, метаболічні та мембранні системи, що тісно взаємодіють між собою. Наприклад, властивості мембран залежать від генної активності, а генетична регуляція впливає на функції мембран [9].

Гормональна регуляція є однією з найважливіших, оскільки вона контролює життя кожної рослини на всіх стадіях її розвитку, а не тільки на

звичайних умовах існування, а й у стресі. Зазвичай він сповільнюється під впливом стресових факторів ріст рослин, вміст індолілоцтової кислоти, гіберелінів і цитокінінів, але зростає кількість інгібіторів – абсцизової кислоти (АБК), етилен, жасмонова кислота. АБК і етилен навіть називають стресовими гормонами. Зниження рівня стимулюючих гормонів і накопичення інгібіторів зростання в умовах стресу має важливе адаптивне значення, оскільки призводить до зниження інтенсивності обмінних процесів, зупинка поділу і росту клітин, перехід організму в стан спокою. В результаті вони витрачаються більш економно запаси енергії, і рослина отримує більше можливостей їх спрямувати на підтримку роботи клітинних структур. Зокрема, значення АБК поширюється практично для всіх процесів клітинного метаболізму. АБК відіграє важливу роль у відповіді рослин на зневоднення, засолення, дію низьких температур, гіпо- та аноксію. Під цим впливом вміст АБК спочатку збільшується за рахунок гідролізу споріднених форм гормону, а потім посилюється синтез АБК в пластидах, і також у коренях, звідки піднімається до надземної частини від ксилеми. Поточний АБК змінює експресію генетичних програм у клітинах: пригнічує синтез мРНК і відповідних їм білків, характерних для нормальних умов, і індукує роботу генів і, отже, синтез специфічних білків. Взаємодіючи з рецептором, АБК запускає каскад реакцій трансдукції, що призводить до накопичення кальцію і залуження цитоплазми. Це, в свою чергу, активізує ряд ферментів трансдукції: кальцій залежні протеїнкінази, магній залежні протеїн-фосфатази, МАРКіназний каскад. У результаті в цитоплазмі посилюються процеси фосфорилювання і дефосфорилювання. Так, регулюється активність ключових ферментів різних метаболічних процесів шляхи та фактори їх транскрипції. Фактори транскрипції, надходячи в ядро, зв'язуються з промоторами різних генів і призводять до їх експресії або репресії [9].

Білки теплового шоку (БТШ) є ключовими у захисті рослин від теплового стресу. Їх синтез активується при збільшенні температури, а їх функції

включають стабілізацію білків, захист мембран і взаємодію з різними біологічними процесами. Температурні сигнали сприймаються рецепторами, що веде до змін генів теплового шоку. Синтез БТШ має обмежену тривалість, після чого розпочинається синтез білків, характерних для нормальних умов. В цілому, рослини використовують різноманітні стратегії, включаючи структурні, фізіологічні та біохімічні адаптації, а також синтез БТШ, для забезпечення жаростійкості в умовах високих температур [7].

Холодостійкість рослин виявляється на різних рівнях, від молекулярного до організмового. Вона визначає здатність теплолюбних рослин переносити низькі позитивні температури. Рослини, які зберігають продуктивність при температурі від 0 до +10°C, називаються холодостійкими. У бобових рослин, зокрема, сої та гороху, холод може спричинити пошкодження черешків та листових пластинок, а коренева система арахісу є найбільш чутливою до низьких температур. За впливу низьких температур, рослини втрачають тургор, порушується транспорт води, що призводить до зниження вмісту внутрішньоклітинної води і далі – посилюються гідролітичні процеси, накопичуються азотисті сполуки та моносахариди. Також збільшується неоднорідність та кількість білка, зокрема з низькою молекулярною масою. Також збільшується проникність мембран через втрату іонів кальцію. Вплив холоду також призводить до розпаду тилакоїдних мембран хлоропластів, порушуючи фотосинтез та дихання рослин. Зміни у мембранах пов'язані з втратою іонів кальцію та активацією фосфоліпідів, що призводить до руйнування мембран та збільшення вмісту вільних радикалів. У холодостійких рослин збільшується стійкість мембран до цих змін. Загалом, холод може призводити до необоротних ушкоджень мембран, руйнування клітинних структур та порушення функцій ферментів, але холодостійкі рослини демонструють більшу стійкість до цих процесів. Низькі температури впливають на рослини, зупиняючи їх ріст та змінюючи баланс фітогормонів, зокрема

збільшуючи вміст АБК та зменшуючи кількість ауксина. Це призводить до змін у транспортних процесах, зокрема зменшення поглиблення NO_3^- та збільшення поглиблення NH_4^+ , особливо у адаптованих рослин. Низькі температури можуть також призводити до загибелі рослин через пошкодження мембран та накопичення токсичних речовин [8].

Холодостійкі рослини залишають свої ферменти активними за різних температур, сприяючи синтезу ненасичених жирних кислот та інших синтетичних процесів. Вони також мають запас цукрів для захисту від негативних впливів низьких температур. Активується синтез стресових білків, що сприяють детоксикації токсичних продуктів розпаду, таких як аміак. Утворення льоду в клітинах та міжклітинних просторах може призводити до загибелі рослин. Цукри, ліпіди і білки самі по собі не викликають утворення льоду, і високомолекулярні молекули полісахаридів можуть діяти як антинуклеатори, знижуючи температуру нуклеації льоду. Також існує неорганічний шлях утворення льоду в рослинах, специфічний для меристематичних тканин, який вважається безпечним, оскільки відбувається в міжклітинних просторах і не порушує цілісність клітинних мембран [6].

Адаптація до холоду включає утворення незвичайних форм мітохондрій. Накопичення кріопротекторів, таких як цукри та інші сумісні осмоліти, допомагає уникнути утворення льоду в клітинах. Наприклад, сахароза накопичується в клітинному соку та хлоропластах, знижуючи кількість льоду, що утворюється. Кріопротекторами є молекули геміцелюлози, спирти та амінокислоти, які знижують точку замерзання цитоплазми. Захисна реакція рослин на холод включає зміни у мембранних ліпідах та плинності мембран. Активація десатураз та синтез антифризних білків гальмують зростання кристалів льоду, знижуючи температуру замерзання. Рослини також синтезують стресові білки холодової відповіді та COR-білки, які забезпечують стійкість клітинних мембран до низьких температур. Дослідження виявило гени та білки,

що реагують на холодний стрес, такі як COR-білки. У рослин також спостерігаються адаптаційні зміни ультраструктури клітин, такі як зменшення обсягу вакуолі, збільшення мембранних елементів та обсягу цитоплазми. Загартовані клітини залишаються непошкодженими завдяки механізмам захисту від дегідратації та кріопротекторам. Загартовані рослини можуть зберігати воду та залишатися морозостійкими. Такі адаптаційні механізми розкривають важливість антифризних білків, стресових білків та змін у структурі клітин для морозостійкості рослин під час холодного стресу [45].

1.2.2. Термострес та механізми адаптації мікроорганізмів до температурного стресу

Мікроорганізми можуть бути класифіковані на три групи: мезофіли, які оптимально ростуть при температурі від $+20^{\circ}\text{C}$ до $+45^{\circ}\text{C}$, психрофіли, що існують у холодних умовах і оптимально ростуть при температурі від $+15^{\circ}\text{C}$ або навіть нижче до $+20^{\circ}\text{C}$; та термофіли, які мають вищу оптимальну температуру росту від приблизно 50°C і вище [49]. Мікроорганізми розпоряджаються різноманітними стратегіями для адаптації до температурного стресу, що дає їм можливість виживати та працювати в умовах надзвичайних температур [19].

Вивчено низку механізмів стійкості до високих температур у мікроорганізмів: адаптація клітини мембрани (зміна складу ліпідів мембран, при зростанні температури, при якій росте бактерія). Температура плавлення ліпідів у складі мембрани збільшується. Це відоме як гомеов'язкісна адаптація. Змінюється насиченість жирних кислот і кількість дво- та триспроменевих мембранних ліпідів. Це допомагає зробити мембрани більш гнучкими і запобігти їх замерзанню за низьких температур [63].

Синтез антифризних білків як механізм адаптації до термостресу [50]: деякі мікроорганізми можуть виробляти антифризні білки, які запобігають утворенню кристалів льоду в клітинах при низьких температурах.

Термостабільні ферменти – ферменти, які працюють при високих температурах (термофільні ферменти) або при низьких температурах (психрофільні ферменти), забезпечуючи нормальний обмін речовин при екстремальних температурах. Осмотична регуляція: деякі мікроорганізми можуть збільшувати концентрацію розчинених речовин у своїй клітині, що запобігає їх замерзанню при низьких температурах. Адаптація метаболічних шляхів: зміна своїх метаболічних шляхів для ефективнішої роботи при екстремальних температурах, наприклад, шляхи окислення та фосфорилування можуть бути адаптовані до високих або низьких температур.

Біологічні ритми як механізм адаптації до термостресу [44]: мікроорганізми можуть регулювати свої біологічні ритми, такі як ритмічні зміни активності та росту, в залежності від змін температури. Підвищена стійкість білків до нагрівання у термофілів: Деякі види мікроорганізмів, які існують у високих температурах (термофіли), мають білки, які відзначаються високою стійкістю до нагрівання. Присутність у клітках специфічних речовин, які стабілізують білки, нуклеїнові кислоти та інші важливі молекули (поліаміни – спермін, спермідин і путресцин), що стабілізують ДНК. Утворення ізоформ ферментів з підвищеною термостійкістю. Ці механізми допомагають організмам адаптуватися до високих температур і забезпечують їхню життєздатність під час теплового стресу [28].

У помірному кліматі ґрунтові бактерії і мікроміцети є багаточисельними, проте підвищення температури на 5°C приводить до збільшення саме популяції бактерій, порівняно з грибами [39]. Різні температурні умови впливають на ключові ферменти, що присутні в N₂-фіксуєючих бактеріях. Наприклад, при низьких температурах близько 5°C нітрогеназа ванадію є найефективнішим ферментом для фіксації N₂. У більш теплих умовах, приблизно 30 °C, нітрогеназа молібдену стає більш ефективною завдяки вищій спорідненості з N₂

порівняно з нітрогеназою ванадію. Висока температура також може сприяти росту нових патогенних штамів на вищих широтах [32].

Згідно з дослідженням Goicoechea [32], розвиток хвороб рослин, спричинених *Verticilium dahliae*, залежить від температури ґрунту. Збільшення концентрації CO₂ сприяє саліциловій кислоті та пригнічує жасмонатну кислоту, що є важливим для більш ефективного захисту від нападу жоржин. Температура ґрунту також різним чином впливає на колонізацію арбускулярних мікоризних грибів (AMF) у різних регіонах з різними співвідношеннями C:N. Дослідження різних авторів показують, що колонізація AMF зростає паралельно з підвищенням температури та pH [26, 32, 39].

Тепловий шок виникає, коли живі клітини піддаються впливу підсмертельних температур (наприклад, для бактерій *E. coli* – це +42°C), що призводить до пригнічення фізіологічної активності, але клітина залишається життєздатною. Основна небезпека, пов'язана з тепловим стресом, полягає у денатурації білків. [65] БТШ поділені на 5 груп залежно від молекулярної маси. До двох основних груп БТШ входять білки-шаперони з молекулярною масою 70 кДа – DnaK (Hsp70) родина, і з молекулярною масою 60 кДа – GroE (Hsp60) родина [37]. До третьої та четвертої груп БТШ належать Hsp90 з молекулярною масою приблизно 90 кДа та Hsp104 з молекулярною масою приблизно 100 кДа. До сімейства HSP100 входять бактеріальні білки Clp теплового шоку та їх дріжджові гомологи Hsp104 та мітохондріальна протеаза Pim1. Clp-білки також беруть участь у клітинній диференціації, впливі патогенів на клітини та регуляції кворум-сенсінгу [50, 64]. Основна роль білків теплового шоку (БТШ) полягає в правильній укладці новосинтезованих поліпептидів та переукладці вже існуючих поліпептидів, які мають невірну структуру через низьку швидкість укладки, вплив хімічних та термічних стресів, внутрішню нестабільність та помилки у процесах транскрипції та трансляції. Тільки поліпептидні ланцюги з правильною конформацією можуть виконувати свої

функції. Білки-шаперони відіграють ключову роль у правильній укладці нових поліпептидів, відновленні пошкоджених ділянок, сортуванні білкових структур за їх біофункціональністю, участі у синтезі білків для реплікації ДНК, реактивації РНК-полімерази, обробці експортованих білків, формуванні білкових комплексів та транслокації білків, а також у відновленні ДНК, яка пошкоджена мутагенами [17, 22, 53]. У *B. subtilis* експресія більше 200 генів підвищується принаймні в 3 рази відносно контрольного рівня під час теплового шоку. Багато з цих генів є частинами загальної відповіді на стрес і контролюються вторинним сигма-фактором, сигма (B), а інші знаходяться під контролем регуляторів HrcA або CtsR теплового шоку. Ця відповідь на тепловий шок різноманітна та залежить від різних типів транскрипційної регуляції. У деяких бактерій вона відбувається за участю альтернативних σ -факторів. У *E. coli*, наприклад, існують 17 основних генів теплового шоку, що індукуються за сублетальних температур. Відзначається значний зріст синтезу БТШ білків, що спостерігається під час теплового шоку. Ця індукція БТШ відбувається за участю мінорного фактора σ_{32} , який швидко збільшується при збільшенні температури [32, 37]. У *Lactobacillus plantarum* збільшений синтез білків теплового шоку покращує бактеріальний ріст при підвищених (+37°C і +40°C) та знижених (+12°C) температурах інкубації. Перевищення синтезу CspL, CspP або CspC також підвищує виживаність бактерій під час зміни температури [29, 33].

У архей, білки теплового шоку подібні до бактеріальних шаперонів, але вони відрізняються за послідовністю амінокислот та схожі на еукаріотні білки TCP1s [6]. Наприклад, у гіпертермофільних архей *Pyrodictium occultum* підвищення температури на 3°C вище оптимальної (+108°C) призводить до того, що 80% всіх цитоплазматичних білків перетворюються у шаперони, які називають термосомами [63]. Проте, активний синтез білків теплового шоку може знижувати синтез інших білків та метаболічні реакції в клітині [49, 68]. У регуляції стабільності білків можуть брати участь і низькомолекулярні сполуки,

які називають хімічні шаперони. Ці сполуки, такі як гліцерин та деякі амінокислоти, можуть стабілізувати білкові молекули *in vitro*, забезпечуючи збереження їхньої функціональної активності навіть в денатураційних умовах. Зниження температури нижче граничного рівня спричиняє холододовий шок, важливий для виживаності клітин у препаратах живих мікроорганізмів, що піддаються заморожуванню, сублімації на холододу, зберіганню та іншим процесам [34]. Для підвищення стійкості мікроорганізмів застосовують різноманітні додатки до живильних середовищ і препарати, що містять кріопротектори [52].

Холодовий стрес впливає на клітини бактерій, знижуючи текучість мембран, ефективність трансляції та транскрипції мРНК через стабілізацію вторинної структури ДНК та РНК. Він також сповільнює згортання білків та перешкоджає функціонуванню рибосом. Клітинна мембрана та стійкість макромолекул до денатурації є важливими факторами для виживаності мікроорганізмів після заморожування та розморожування [53]. Під час холододового стресу відбувається кріоадаптація, що включає у себе збільшення кількості ненасичених жирних кислот та С19-жирної кислоти, що підвищує текучість мембран. Психрофіли мають мембрани з підвищеною текучістю завдяки коротколанцюговим та ненасиченим жирним кислотам. Деякі мікроорганізми виробляють антифризові білки, які запобігають зростанню кристалів льоду [40]. Присутність кріопротекторів, осмолітів (бетаїн, карнітин), сприяє виживаності клітин після заморожування, ліофілізації та розморожування. Холодовий шок не викликає денатурації білків, але призводить до змін у молекулах та біохімічних реакціях порівняно з мезофільними або гіпертермофільними організмами. Активність багатьох ферментів та загальний метаболізм зменшуються, і текучість мембран ускладнює транспорт речовин у клітину. Також утворюються кристали льоду, які пошкоджують клітинні структури та призводять до загибелі організму [25]. Мікроорганізми реагують

на низькі температури, синтезуючи білки холодового шоку (БХШ), що підтримують текучість мембран, структуру ДНК та РНК, а також інші важливі функції у клітинах, адаптованих до низьких температур [40]. Ці білки включаються у синтез білків та укладання мРНК. У молочнокислих бактерій, наприклад, спостерігається зростання синтезу холод-індукованих білків, які зв'язуються з РНК і полегшують процес трансляції при знижених температурах [27].

Таким чином, рослини і мікроорганізми мають як окремі спільні механізми захисту від термостресу, так і унікальні шляхи запобігання розвитку незворотних реакцій, що можуть призвести до загибелі клітини чи організму. Проте між рослинами і мікроорганізмами, що з ними асоційовані, ендofітами у тому числі, існують стійкі сигнальні зв'язки, що можуть допомогти кожному учаснику симбіозу подолати різні вид біотичних і абіотичних впливів. Розуміння цих механізмів взаємодії між сільськогосподарськими рослинами та мікроорганізмами фітосфери дозволить покращити продуктивність агроценозів.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота була виконана на кафедрі фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Об'єктом дослідження було насіння різних сортів гороху посівного (*Pisum sativum* L.) вітчизняної селекції (Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН Україна), що включені до Держреєстру України. Сорти гороху посівного є посухостійкими та слабо пошкоджуються шкідниками і хворобами. У роботі використано насіння 2020 року врожаю таких сортів: Дамір, Ефектний, Камелот, Маскара, Малахіт.

Схема дослідження



Визначення жаростійкості насіння гороху посівного

Перед початком дослідження насіння пророщували у ростильнях 24 години. Після цього його розкладали у чашках Петрі і витримували у термостаті при певній температурі 20 хвилин. Після цього контрольні та дослідні зразки культивували у термостаті за температури +20°C.

На 3 добу дослідження здійснювали визначення енергії проростання насіння гороху. Розрахунки проводили за формулою:

$$EP = a/b * 100\% \quad (1)$$

де: EP – енергія проростання, відсоток пророслого насіння (%),

a – кількість схожого насіння (шт.),

b – загальна кількість насіння у досліді (шт.)

На 5 добу дослідження проводили визначення відсотка схожого насіння та довжину проростків гороху, депресію ростових процесів надземної та підземної частин проростків гороху посівного. Розрахунки проводили за формулою:

$$LC = a/b * 100\% \quad (2)$$

де: LC – лабораторна схожість, відсоток пророслого насіння (%),

a – кількість схожого насіння (шт.),

b – загальна кількість насіння у досліді (шт.).

$$Z = 100 - (y/x), \text{ де} \quad (3)$$

y – середнє значення показника у варіанті досліді,

x – середнє значення показника на контролі.

Визначення холодостійкості насіння гороху посівного

Перед початком дослідження насіння пророщували у чашках Петрі протягом доби. Після цього насіння розкладали на стерильний фільтрувальний папір у ростильні (Рис.2.1) і культивували за температури 4°C у холодильній

камері (дослід), а контрольні варіанти у термостаті за температури $+20^{\circ}\text{C}$ протягом 3 та 5 діб.



Рис 2. 1. Дослідження впливу високих температур на ростові процеси насіння гороху посівного (*Pisum sativum* L.), лабораторний дослід.

На 3 добу дослідження проводили визначення енергії проростання насіння гороху (1). На 5 добу дослідження проводили визначення лабораторної схожості (2), довжину проростків гороху та депресію ростових процесів надземної та підземної частин проростків гороху посівного (3).



Рис. 2.3. Дослідження впливу низьких температур на ростові процеси насіння гороху посівного (*Pisum sativum* L.), лабораторний дослід.

Визначення активності амілази у сім'ядолях гороху посівного

Рослинний матеріал розтирали з 10 мл 100 mM ацетатного буферу (pH=5,0) та переносили у пробірки і центрифугували 15 хв за 3 тис. об/хв. У дві паралельні пробірки для кожного варіанту вносили інкубаційне середовище такого складу:

Дослід	Контроль
3 мл ацетатного буферу	3 мл ацетатного буферу
1 мл витяжки	1 мл 1 н HCl
1 мл 3% розчину крохмалю	1 мл витяжки
	1 мл 3% розчину крохмалю

Пробірки інкубували у водяній бані при температурі 25°C 30 хв. Після інкубації у дослідну пробірку додати 1 мл 1 н НСІ для зупинки реакції. Визначення активності амілази проводили за різницею у вмісті крохмалю у дослідній і контрольній пробірках. Для цього у пробірки вносили 0,5 мл інкубаційного середовища, 0,1 мл 0,3% I₂ у КІ та 0,1 мл 0,1 н НСІ і доводили до 10 мл. Визначення оптичної густини проводили у 0,5 мм кюветах при довжині хвилі 590 нм (помаранчевий світлофільтр) [48].

Вивчення ендофітної мікрофлори насіння гороху посівного

Вивчення ендофітної мікрофлори проводили шляхом дослідження колоній бактерій, що утворилися на м'ясопептонному агарі. Для цього на поверхню застиглого середовища розкладали сім'ядолі, корінці та оболонку насіння гороху посівного (на 5 добу).

Обчислювали показник частоти трапляння видів бактерій:

$$A = B * 100\% / C, \quad (4)$$

де

A – частота трапляння морфотипу;

B – кількість зразків, у яких виявлено цей морфотип;

C – загальна кількість виділених морфотипів.

Відносну рясність морфотипу розраховували як співвідношення частоти трапляння певного морфотипу до загальної кількості морфотипів [14].

У роботі на рисунках представлено усереднені результати вимірювань та похибку середнього. Порівняння отриманих результатів проводили з використанням параметричних критеріїв (t-критерій Стюдента при $p \leq 0,05$) [2].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У процесі еволюції рослини розвинули генетичні механізми для підвищення жаростійкості. Захисні стратегії можна поділити на уникнення перегріву та адаптацію до високих температур. Уникнення перегріву включає анатомічні пристосування, такі як особливості листя (ксероморфізм, згортання, волоски, віск), багат шарову структуру палісадної паренхіми та шаровитий епідерміс. Підвищена транспірація, збільшуючи випаровування води, сприяє охолодженню листя. Біохімічні адаптації рослин включають високий вміст прочно зв'язаної води, наявність осмотично активних речовин, антиоксидантні системи та стабільність ліпідів і білків мембран. Адаптація до високих температур пов'язана зі змінами у складі мембранних ліпідів, що впливає на їх структурну міцність та температурний фазовий перехід. Регулювання ступеня насиченості жирних кислот відбувається за допомогою ферментів, таких як десатурази, тіоестерази і елонгази [7].

Рослини адаптуються до стресу через швидкі захисні системи, тимчасовий захист та формування тривалих механізмів адаптації. Пасивна адаптація полягає в «відходженні» від стресора або співіснуванні з ним. Ці реакції включають утворення поверхневої кореневої системи при нестачі кисню, опускання листя, їх зменшення чи опадання, а також закриття стом для зменшення втрат води під час посухи. Активна адаптація вимагає енергії та синтезу нових захисних компонентів. Включає індукцію синтезу нових ферментів чи білків, які забезпечують захист клітин та підтримують метаболізм в змінених умовах [11]. Рослини можуть використовувати як пасивні, так і активні механізми адаптації. Адаптація рослин до стресових умов пройшовши два етапи: спочатку відбувається швидка стрес-реакція, яка забезпечує тимчасовий захист, а потім розвивається тривалий процес спеціалізованої адаптації, під час якого рослини синтезують нові ферменти та білки для життя в змінених умовах. Якщо стресор

припиняє свій вплив, рослина поступово відновлюється, в іншому випадку може настати непередбачуване пошкодження або загибель рослини [7].

За останні десятиліття велика кількість даних задокументувала вплив теплового стресу на рослини гороху посівного. Виявлено, що температура є критичним фактором, що обмежує проростання насіння. Відбір сортів гороху, що є стійкими до дії термостресу допомогло у вирощуванні цієї культури у жорстких умовах [59]. Тому ця робота була проведена з метою дослідження вплив різних високих та низької температур на проростання насіння та ріст проростків *Pisum sativum* L. Крім того були досліджені зміни активності амілази та визначено ендофітну мікрофлору насіння в умовах термостресу.

3.1. Вивчення термостійкості проростків гороху посівного

Результати дослідження впливу високої температури на енергію проростання проростків гороху посівного (показник визначається на 3 добу пророщування) показало, що досліджені сорти різнилися за ступенем чутливості до впливу високої температури (Рис. 3.1). Енергія проростання насіння гороху посівного сорту Дамір у контрольному варіанті дорівнювала 90,6%. За умов впливу високих температур спостерігалось зниження показників, так у варіанті 45°C показник був 72,7%, у варіанті 50°C – 79,5%. Температура вище ніж 50°C (55°C, 60°C, 65°C) повністю пригнічувала ростові процеси у насінні гороху досліджуваного сорту.

Енергія проростання насіння гороху посівного сорту Ефектний у контрольному варіанті дорівнювала 97,8% (Рис. 3.1). У варіантах досліду 45°C та 50°C спостерігалось незначне зниження енергії проростання на 8% та 3%, відповідно. Більш висока температура 55°C призводила до пригнічення проростання насіння на 15 % у порівнянні з контрольним варіантом.

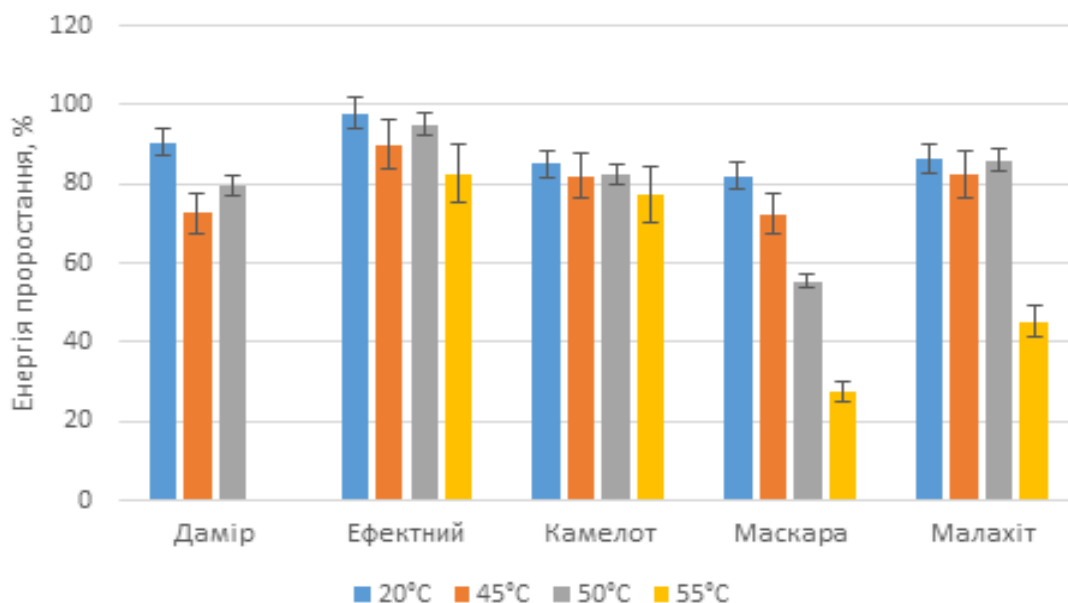


Рис. 3.1. Вплив високих температур на енергію проростання насіння гороху, %

Показники енергії проростання насіння гороху посівного сорту Камелот були близькими до показників сорту Ефектний (Рис. 3.1). Так у контрольному варіанті спостерігалось 85% пророслого насіння. У варіантах досліду 45°C та 50°C енергія проростання знижувалася на 2,5% у порівнянні з контрольним варіантом. За умов впливу температури 55°C енергія проростання знижувалася на 7,5 %. Енергія проростання насіння гороху посівного сорту Маскара у контрольному варіанті дорівнювала 82,5%. У дослідних варіантах спостерігалось суттєве зниження показників. Так встановлено, що температура 45°C пригнічувала проростання насіння на 10% у порівнянні з контрольним варіантом, температура 55°C на 27,5% у порівнянні з контролем. За температури 55°C спостерігалось суттєве пригнічення проростання насіння, енергія проростання становила 27,5% (Рис. 3.1).

Дослідження впливу високої температури на енергію проростання насіння гороху посівного сорту Малахіт показало, що суттєвий вплив серед досліджених

температур чинила температура 55°C (Рис. 3.1). Показники у контрольному варіанті дорівнювали 86,4%. У варіантах досліду 45°C та 50°C спостерігалось незначне зниження показників енергії проростання на 4% та 0,5% відповідно, у порівнянні з контрольним варіантом. За температури 55°C пригнічення енергії проростання насіння становило 45,2%, що на 41,2% менше у порівнянні з контрольним варіантом.

Таким чином, досліджені сорта гороху посівного мали різний ступінь чутливості до впливу високої температури. Найбільш стійкими до дії температурного стресу виявилися сорта Ефектний та Камелот. Більш чутливими насіння сорту Малахіт і Маскара. Насіння сорту Дамір виявилось найбільш чутливим до дії високих температур.

У дослідженні були визначені показники лабораторної схожості насіння досліджуваних сортів гороху посівного, даний показник визначається на 5 добу пророщування (Рис. 3.2).

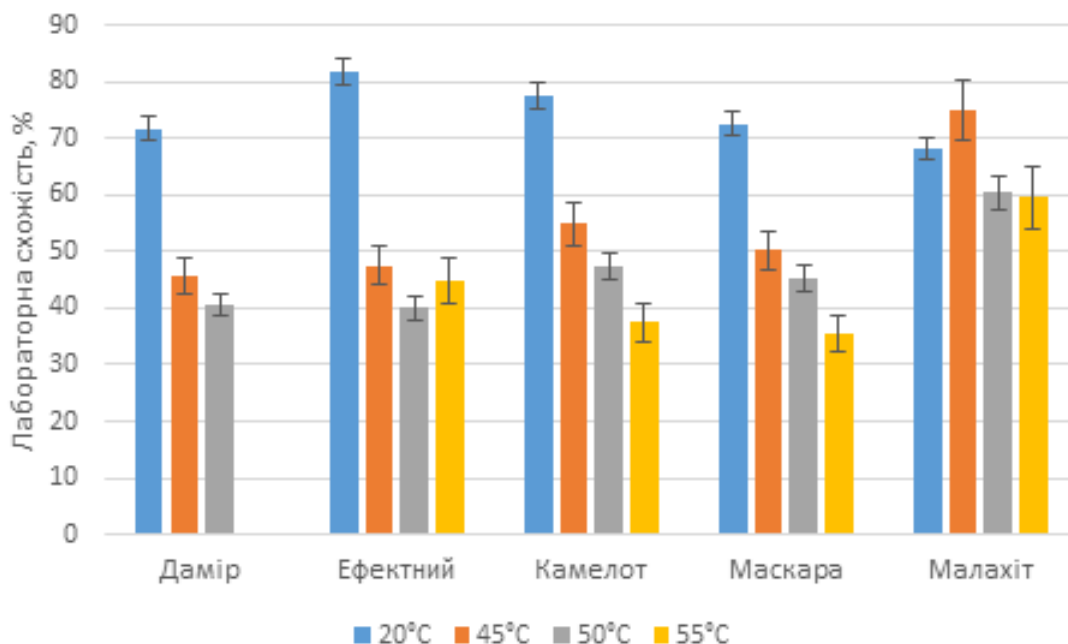


Рис. 3.2. Вплив високих температур на показники лабораторної схожості насіння гороху, %

Лабораторна схожість насіння гороху посівного сорту Дамір у контрольному варіанті досліду (20°C) становила 71,8%. У варіантах досліду 45°C та 50°C спостерігається пригнічення показників схожості на 26,3 та 31,3% відповідно, у порівнянні з контрольним варіантом. У варіантах з більш високими температурами 55°C, 60°C та 65°C спостерігалось повне пригнічення ростових процесів.

Показники лабораторної схожості насіння гороху посівного сорту Ефектний у контрольному варіанті становили 81,7%, у дослідних варіантах показники схожості були нижчі у порівнянні з контролем. Так, температура 45°C пригнічувала показники лабораторної схожості на 34,2%, температура 50°C на 41,7%, а температура 55°C на 36,7%.

Насіння гороху посівного сорту Камелот та сорту Маскара мали схожі показники лабораторної схожості за умов впливу високої температури. Так температура 45°C пригнічувала схожість насіння гороху посівного на 22,4%, температура 50°C в середньому на 28,6%, температура 55°C – на 38,6% у порівнянні з контрольним варіантом.

З досліджених сортів гороху посівного насіння сорту Малахит показали високі показники лабораторної схожості за умов впливу досліджених температур у порівнянні з іншими дослідженими сортами. Так температура 45°C знижувала показники лабораторної схожості на 3,2%, температура 50°C – на 7,7%, температура 55°C – на 8,7%.

Таким чином, за дії високої температури під час пророщування насіння гороху посівного, показники лабораторної схожості показали, що насіння сорту Малахит серед досліджених сортів гороху проявляє високу стійкість до впливу високих температур, пригнічення ростових процесів за температури 55°C було в межах 9%. Для насіння гороху посівного сортів Ефектний, Камелот та Маскара спостерігалось пригнічення схожості за температури 55°C на 36-40% у

порівнянні з контролем. Насіння гороху посівного сорту Дамір не мали ознак розвитку за умов впливу температури 55 за температури 55°C.

За літературними даними, механізми, пов'язані з надзвичайною стійкістю насіння до висихання, можуть забезпечити перехресну толерантність проростаючого насіння до інших абіотичних стресів, таких як температура. Цей тип стресу має велике значення, оскільки він є основним обмеженням для сільського господарства [62]. Рослини реагують на коливання температури змінами в швидкості метаболізму, обміні білка, осмолітах, функції мембрани та експресії генів. Виявлені особливості сортів по відношенню до високої температури можуть бути пов'язані з сортовими особливостями досліджених сортів гороху.

Подальші дослідження були пов'язані з визначенням депресії ростових процесів проростків гороху посівного за умов впливу високих температур. Результати дослідження депресії ростових процесів проростків гороху посівного сорту Дамір показали, що за умов дії високої температури відбувається пригнічення росту як надземної, так і підземної частин проростків (Рис. 3.3, Рис. 3.4). показано, що ріст надземної частини проростків за умов дії температури 45°C пригнічується на 55,9%, а за умов дії температури 50°C на 41,2%. Реакція підземної частини проростків даного сорту на дію температури був менш виражений. Пригнічення росту проростків гороху за дії температури 45°C було на 18,7%, а за дії температури 50°C на 4%.

Показники депресії ростових процесів проростків гороху посівного сорту Ефектний були більш виражені за дії температур 50°C та 55°C. Депресія ростових процесів за дії температури 50°C склала для надземної частини проростків 30,6%, а для підземної 31,7%. Інкубація насіння за 55°C викликала депресію ростових процесів надземної частини на 8,4%, а підземної на 10,9%. За дії температури 45°C спостерігалось зменшення довжини надземної частини

проростків на 1,9% і збільшення довжини підземної частини проростків на 2,3%.

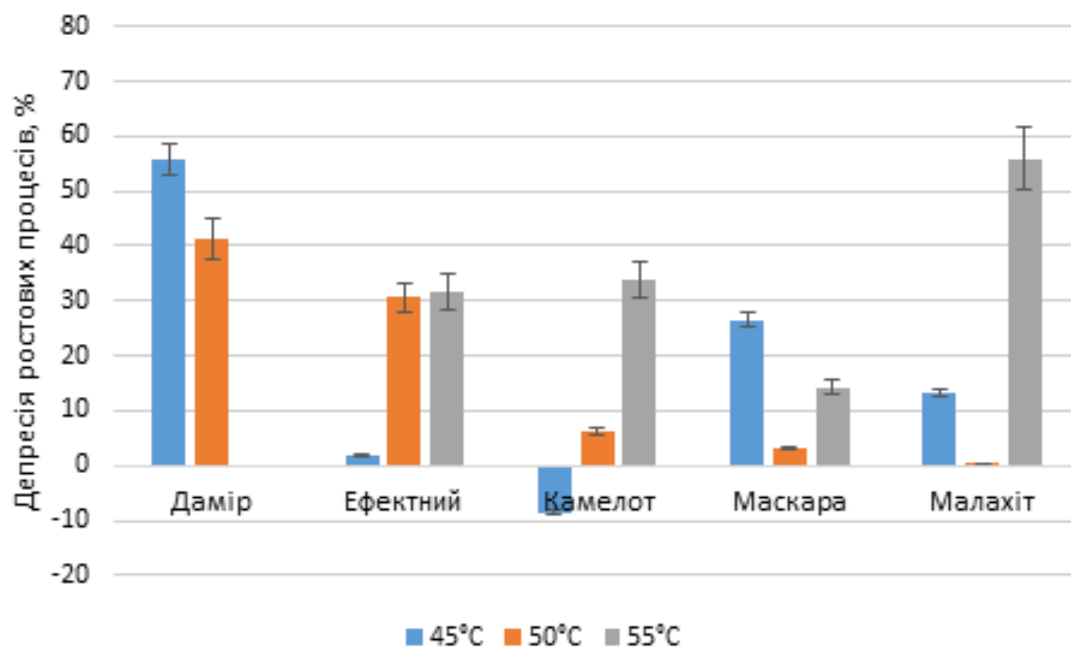


Рис. 3.3. Депресія ростових процесів надземної частини проростків гороху, %

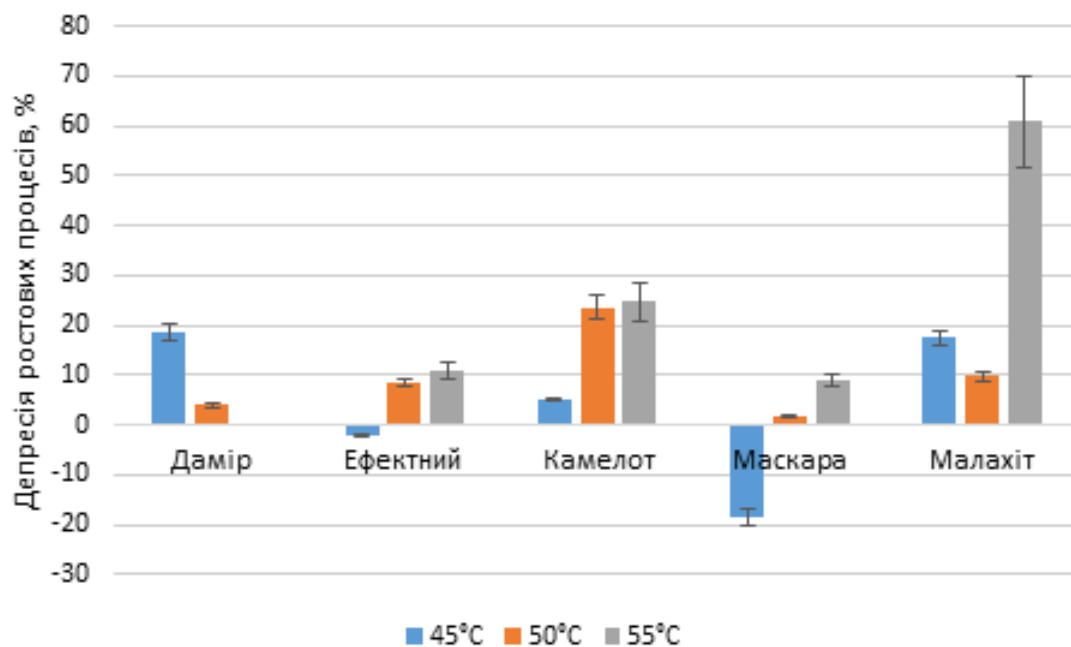


Рис. 3.4. Депресія ростових процесів підземної частини проростків гороху, %

Депресія ростових процесів проростків гороху посівного сорту Камелот, як і у попередніх сортів збільшувалася з підвищенням температури інкубації насіння. Так, за умов дії температури 45°C спостерігалася стимуляція ростових процесів надземної частини рослин на 8,5% і депресія ростових процесів підземної частини на 5,1%. Показники депресії за дії температури 50°C були більш виражені для підземної частини проростків (23,6%), а за дії температури 55°C як для надземної (33,9%) так і для підземної (24,7%).

Результати дослідження депресії ростових показників проростків гороху посівного сорту Маскара показали, що за дії температури 45°C спостерігається пригнічення росту надземної частини проростків на 26,5%, і більш активний ріст підземної частини проростків. За дії температури 50°C спостерігається незначна депресія ростових процесів як надземної так і підземної частини проростків, показники склали 3,2% та 1,7%, відповідно. За дії температури 55°C депресія ростових процесів надземної частини проростків була більшою (14,3%) у порівнянні з підземною частиною проростків (8,9%).

Показники депресії ростових процесів проростків гороху посівного сорту Малахит були високими за умов впливу на насіння гороху температури 55°C, так для надземної частини показник склав 55,9%, для підземної 61,0%. Низькими показниками депресії характеризувалися проростки за умов впливу температури 50°C, для надземної частини цей показник склав 0,1%, для підземної 9,8%. Показники за умов впливу температури 45°C склали 13,3% для надземної і 17,5% для підземної частини проростків гороху посівного.

Визначення впливу низьких температур на ростові показники проростків гороху

Для комплексної оцінки впливу термостресу на насіння гороху посівного було визначено вплив низьких температур на ростові процеси. Результати дослідження показали подібний характер зміни показників енергії проростання

та лабораторної схожості у всіх досліджуваних сортів гороху посівного (Рис. 3.5, Рис. 3.6). Так показники енергії проростання насіння у контрольних варіантах були вищі ніж у варіантах, що пророщувалися за температури 4°C. Високі показники енергії проростання були характерні для зразків насіння гороху посівного сортів Ефектний та Маскара, суттєвого впливу низької температури на насіння даних сортів не виявлені, показники у досліді і контролі були близькі. Енергія проростання насіння гороху посівного сортів Камелот та Малахітна у контрольних варіантах склала 75% та 86% відповідно, а за умов дії низької температури 65% та 75% відповідно. Найбільш чутливим до дії низької температури виявився сорт Дамір, різниця між контролем та дослідом склала 15%.

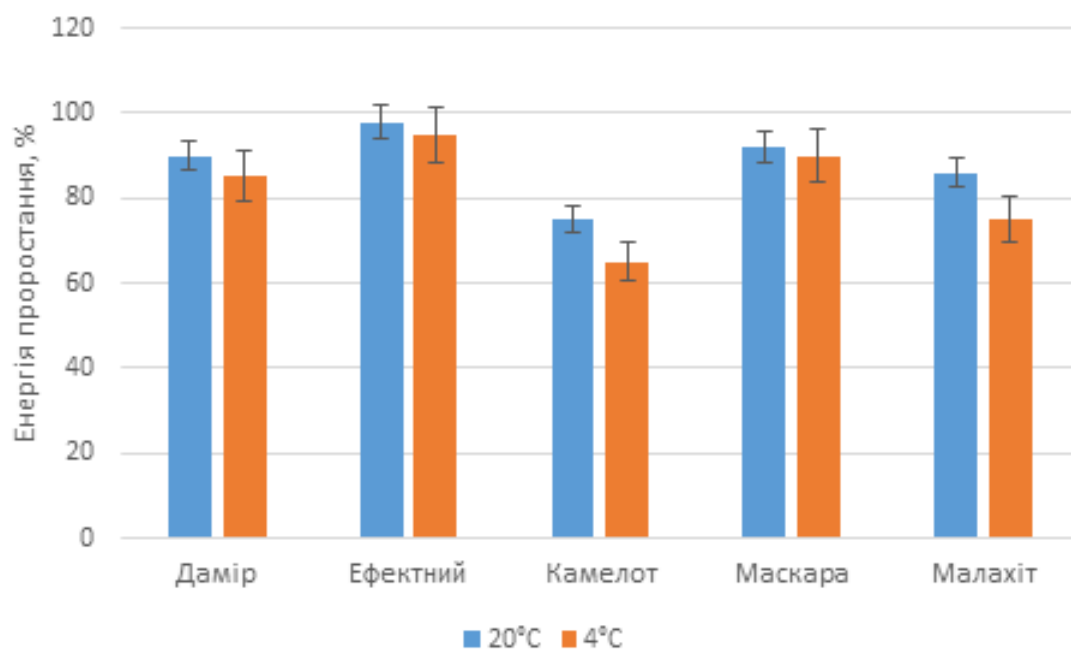


Рис. 3.5. Вплив низьких температур на енергію проростання насіння гороху, %

Наступним етапом було визначення показників лабораторної схожості насіння гороху посівного за умов впливу низької температури (Рис 3.6). Так показники лабораторної схожості за умов розвитку насіння за температури +4°C

були вищими для всіх варіантів досліду, у порівнянні з контрольними зразками, що пророщувалися за температури $+20^{\circ}\text{C}$. Таким чином, не дивлячись на ефект пригнічення низькою температурою енергії проростання (3 доба дослідження) насіння гороху посівного, спостерігається активація ростових процесів у насінні при тривалому культивуванні за умов низької температури, на що вказує більш високі показники лабораторної схожості насіння гороху посівного (5 доба дослідження).

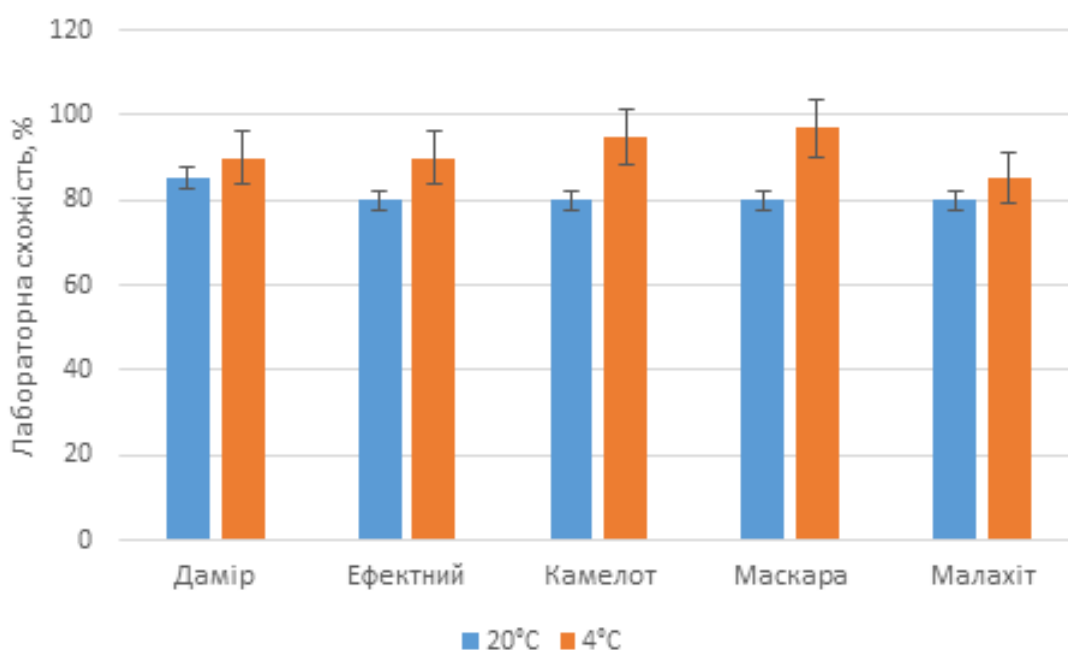


Рис. 3.6. Вплив низьких температур на показники лабораторної схожості насіння гороху, %

Показники депресії ростових процесів у проростків досліджуваних сортів гороху посівного мали схожий характер прояву, так показники депресії ростових процесів надземної частини рослин були вищими ніж показники депресії ростових процесів підземної частини (Рис. 3.7).

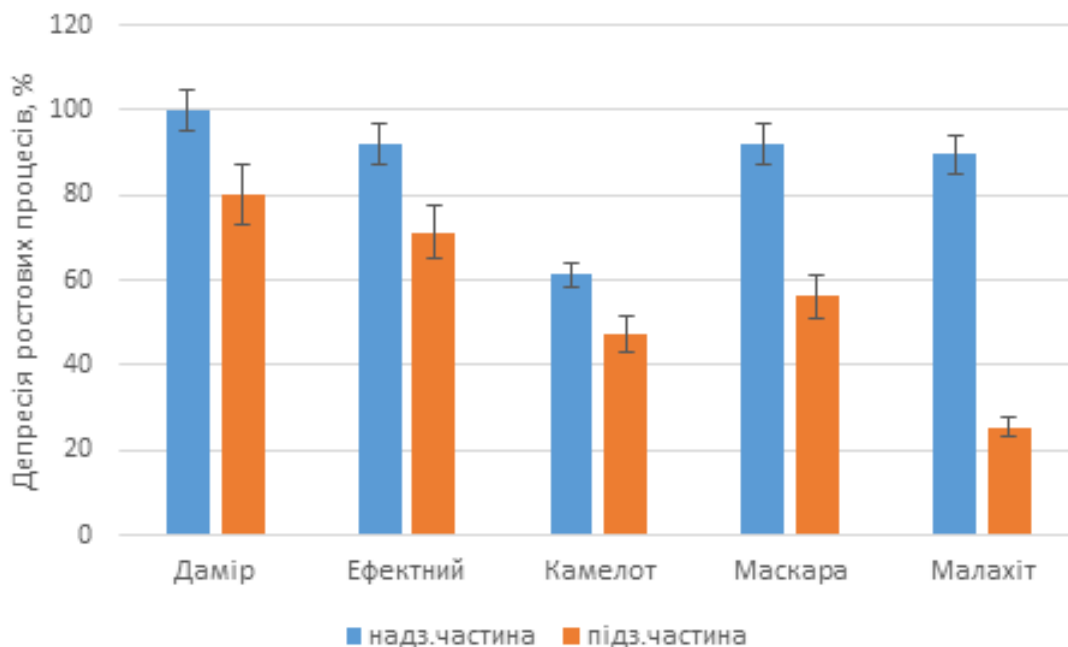


Рис. 3.7. Депресія ростових процесів проростків гороху, %

За даними літератури [62], у гороху посівного витягування проростків відбувається в діапазоні досить низьких температур ($+5 - 20^{\circ}\text{C}$), проте ця стадія є більш чутливою до низьких температур, ніж проростання, коли молоді сходи мають високий вміст води. Більш високі вимоги до температури для витягування проростків, ніж для проростання, є звичайними для бобових.

Визначення впливу термостресу на активність амілази у сім'ядолях гороху посівного

Широко розповсюдженим ферментом вищих рослин є α -амілаза. Процеси проростання насіння гороху супроводжуються процесами деградації запасного крохмалю, що залежить від активності α -амілази у сім'ядолях. Так, у сім'ядолях гороху активність амілази збільшується протягом 10 діб пророщування насіння [36]. Під час адаптації рослин до умов стресу відбуваються фізіологічні та біохімічні перебудови, пов'язані із зміною асиміляції CO_2 , іонного транспорту, темпів росту, біосинтезу білків. На ріст, розвиток та продуктивність рослин

особливо негативно впливає дефіцит вологи та температура. Зміна активності α -амілази є чутливим маркером стресу, що зумовлено активацією її інгібіторів у період гетеротрофного етапу онтогенезу рослин. Оптимальною температурою для проростання та розвитку росту гороху є температура $+13-20^{\circ}\text{C}$ і $+15-25^{\circ}\text{C}$ відповідно. Коли температура повітря вище оптимального рівня, це може вплинути на вегетативний розвиток шляхом зниження відсотка пророслого насіння, сходів, збільшення ненормальних сходів [60].

Виходячи з цього, в роботі визначали активність амілази у сім'ядолях гороху посівного за умов термостресу на 3 та 5 добу пророщування насіння. Результати дослідження впливу температури на активність амілази у сім'ядолях досліджуваних сортів гороху посівного на 3 та 5 добу пророщування представлені на рисунках 3.8 та 3.9. Досліджені сорти гороху посівного різнилися за показниками активності амілази, тож різні високі температури підвищували або знижували активність амілази у сім'ядолях.

Через 3 доби інкубації, активність амілази у сім'ядолях гороху сорту Дамир за обробки температурою 45°C знижувалася на 25,8%, а за дії $+50^{\circ}\text{C}$ – підвищувалася на 36,2%, по відношенню до контролю. Через 5 діб за температури 45°C активність амілази була близька до контролю, різниця склала 3%, а за короткочасної дії температури $+50^{\circ}\text{C}$ відбувалося зниження активності ферменту на 42%.

Активність амілази у сім'ядолях гороху посівного сорту Ефектний на 3 добу інкубації була вищою у всіх варіантах досліду 45°C , 50°C та 55°C , у порівнянні з контролем, різниця склала 43,7%, 63,8% та 28,6%, відповідно. У варіанті досліду з впливом температурою 45°C , на 5-ту добу встановлено стимулювання активності ферменту на 4,7%, а за більш високої температури відбувалося його інгібування. Так, у варіанті з впливом температури 50°C встановлено пригнічення активності амілази на 5,9%, а у варіанті з температурою 55°C – на 21,2%.

Активність амілази у сім'ядолях гороху посівного сорту Камелот на третю добу культивування за температури 50°C була нижчою, у порівнянні з контролем (на 24,9%), а у варіантах впливу температур 45°C та 55°C, активність фермента була близька до контролю. На 5 добу вирощування спостерігалось зниження активності амілази за умов дії високої температури в усіх варіантах дослідів, порівняно з контролем.

Активність амілази у сім'ядолях гороху посівного сортів Маскара на 3 та 5 добу дослідження була нижчою за показники у контрольному варіанті. За дії температури 45°C активність амілази знижувалась на 38,5% на 3 добу і на 4,1% на 5 добу – таким чином, активність фермента на 5 добу була близькою до показників у контролі. У варіанті з температурою 50°C відбувалося пригнічення активності ферменту на 28,5% на 3 добу та на 34,4% – на 5 добу спостережень. У варіанті з впливом температури 55°C, активність амілази суттєво знижувалась на 3 добу культивування (різниця з контролем склала 72,1%), а також і на 5 добу – на 35,1%.

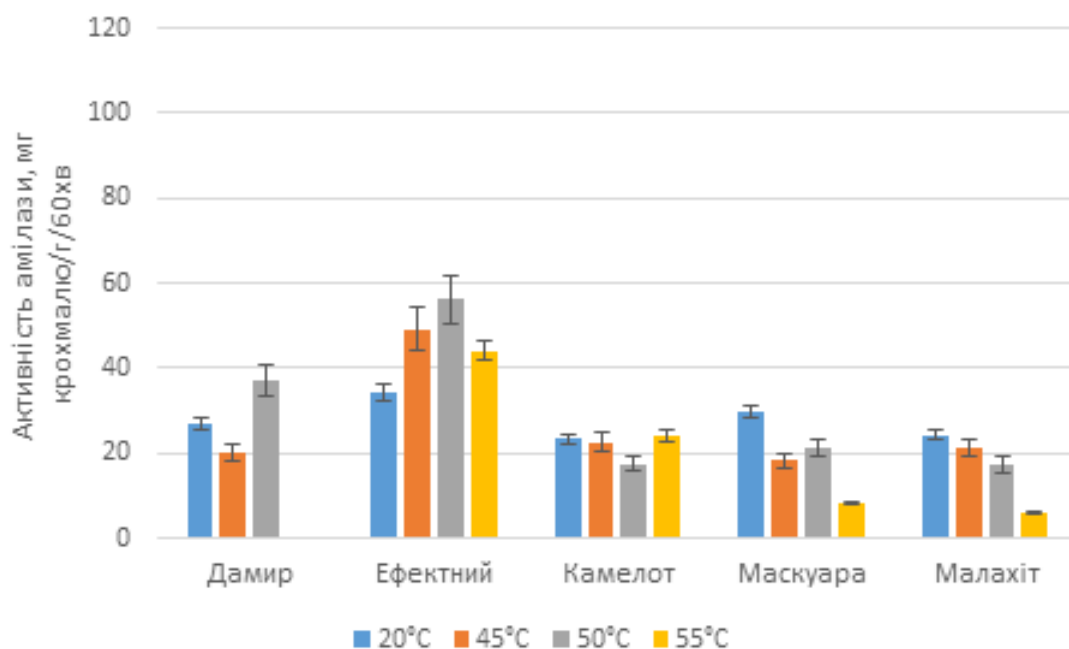


Рис. 3.8. Вплив високої температури на активність амілази у сім'ядолях гороху посівного, 3 доба дослідження, мг крохмалю/г сирової речовини/60 хв

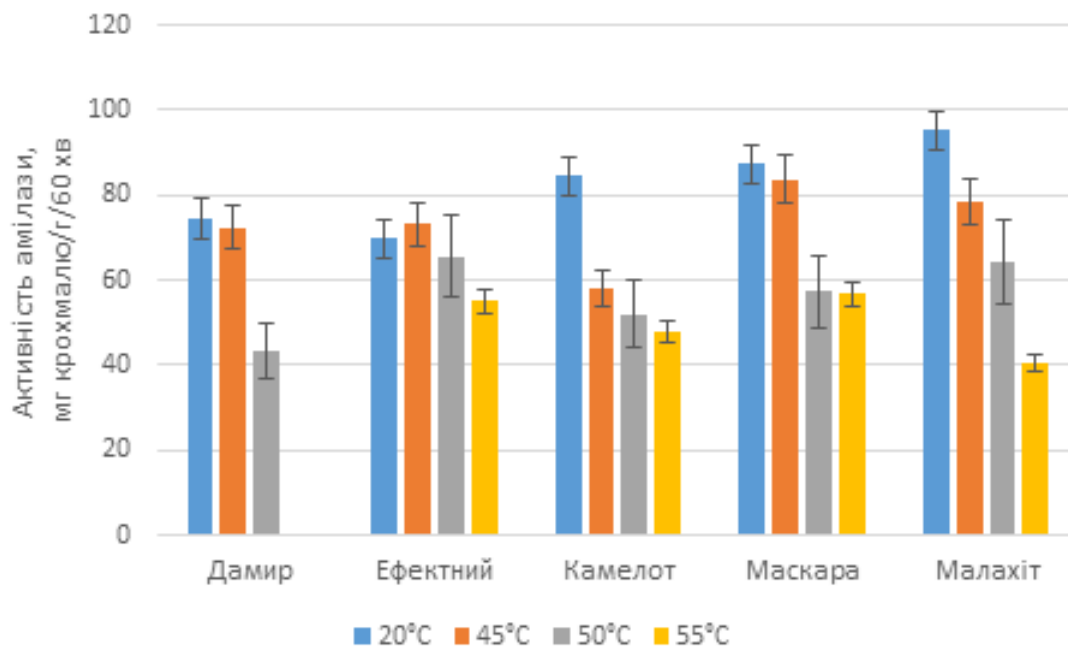


Рис. 3.9. Вплив високої температури на активність амілази у сім'ядолях гороху посівного, 5 доба дослідження, мг крохмалю/г сирової речовини/60 хв

Активність амілази у сім'ядолях гороху посівного сорту Малахіт за дії високої температури знижувалася у всіх варіантах досліду як на 3 так і на 5 добу дослідження. Температура 55°C мала найбільший інгібуючий ефект на активність фермента показники були 74,7% та 57,4% відповідно на 3 та 5 добу у порівнянні з контролем.

Результати дослідження впливу низької температури на активність амілази у сім'ядолях гороху посівного представлені на Рис. 3.10. Так, низька температура пригнічувала активність амілази у сім'ядолях всіх досліджуваних сортів як на 3 так і на 5 добу дослідження, за винятком варіанту сорту Малахіт, на 3 добу дослідження спостерігалася стимулювання активності амілази, у порівнянні з контролем. З іншого боку, при порівнянні показників активності амілази за дії низької температури впродовж дослідження, спостерігалася збільшення активності ферменту з 3 по 5 добу, що узгоджується з даними літератури [48].

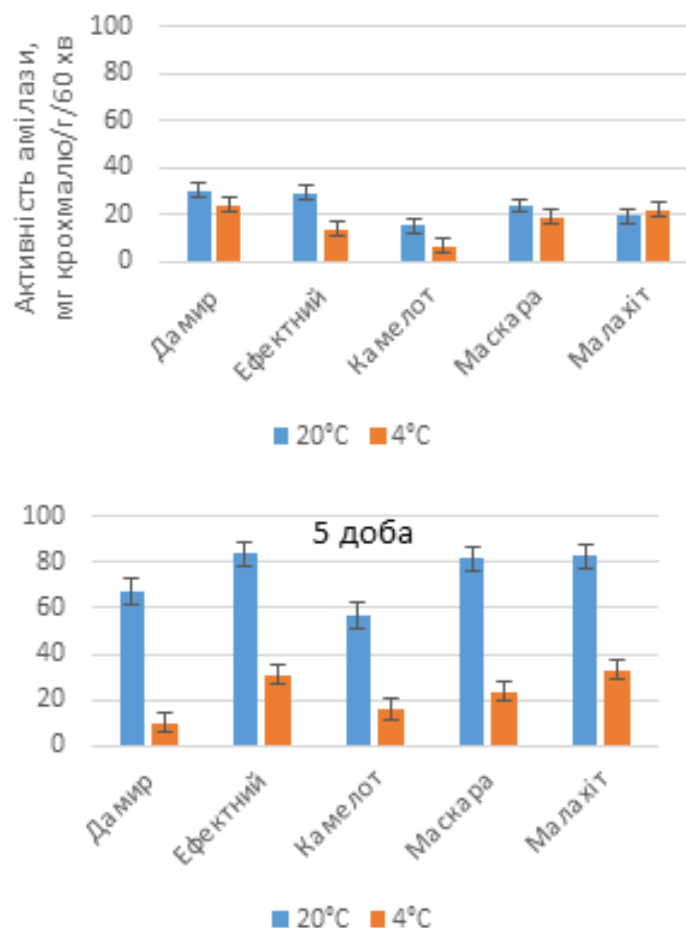


Рис. 3.10. Вплив низької температури на активність амілази у сім'ядолях гороху посівного, мг крохмалю/г сирої речовини/60 хв

Таким чином, показано зниження активності амілази у сім'ядолях всіх досліджуваних сортів гороху посівного за дії низької температури. Найбільш чутливим до дії низької температури виявилось насіння сорту Дамир, найменш чутливим – насіння сортів Ефектний та Малахіт.

3. 2. Вивчення ендофітної мікрофлори насіння гороху посівного

Ендофітні мікроорганізми – ендосимбіотичних мікроорганізмів, які живуть у тканинах рослин. За взаємодії рослина-ендофіт, ендофіти отримують

вуглеводи, а натомість вони приносять користь рослинам для покращення стресостійкості. Ендофіти колонізують апопласти рослин, проміжки між клітинною стінкою та корневими ксилемними каналами, стеблами, листям, квітами, плодами та насінням рослин. Було показано, що ендофіти допомагають рослинам реагувати на стресове середовище шляхом обміну основних поживних речовин і ферментів, а також виробництва вторинних метаболітів. Ендофіти можуть виробляти такі фітогормони, як цитокінін та індолоцтова кислота (IAA) [61]. Ендофітна мікрофлора насіння сприяє проростанню та збереженню насіння, готуючи відповідне середовище в його оточенні шляхом синтезу специфічних метаболітів. Під час початкової стадії проростання насіння поглинає воду та виділяє екsudати, які мають здатність захоплювати бактерії, що колонізують ризосферу, спермосферу і проростки, дозволяючи їм прямо чи опосередковано підвищувати ріст і енергію рослин [59].

З метою визначення ролі ендофітної мікрофлори насіння гороху посівного нами були досліджені колонії бактерії, що колонізують насіння гороху за умов термостресу.



Рис. 3. 11. Колонії представників ендофітної мікрофлори насіння на твердому поживному середовищі

У Таблиці 3.1 представлені показники частоти трапляння бактерій, що колонізують різні частини проростків досліджуваних сортів гороху посівного.

Таблиця 3.1.

Частота трапляння бактерій, виділених із сім'ядоль і корінців проростків гороху посівного

Мікроорганізм	Частота трапляння, %		
	Оболонка зерна	Сім'ядолі	Корінці (поверхня)
Грамнегативні мікрококи	76	18	32
Грамнегативні кокобацили	62	відсутні	25
Грамнегативні палички	78	12	44
Грамваріабельні палички	68	22	15
Грампозитивні палички	відсутні	14	50

Результати дослідження показали, що найчастіше на середовище МПА виявлялися грамнегативні бактерії: коки, кокобацили та палички, грамваріабельні та грампозитивні палочки. Найбільшу кількість бактерій спостерігали на оболонці насіння, частота трапляння бактерій була найвищою серед досліджених варіантів. На поверхні коренців виявлено велику кількість грамнегативних та грампозитивних паличок, частота трапляння становила 50% та 44%, відповідно. На поверхні сім'ядолей насіння гороху кількість бактерій була найнижчою, у порівнянні з оболонкою та корінцями, найбільший відсоток трапляння був характерний для грамваріабельних паличок та грамнегативних коків.

Таблиця 3.2.

**Частота трапляння і рясність морфотипів бактерій із сім'ядоль і корінців
проростків гороху**

Зовнішній вигляд колоній на середовищі МПА	Частота трапляння, %	Рясність, %
Округлої форми, опуклі, блискучі, краї рівні, брудно-білого кольору або прозорі. Діаметром 5–7 мм, поверхня гладенька	100	34,4
Округлої форми, блискучі, краї рівні, плоскі, жовтуватого кольору. Діаметром 2–4 мм, поверхня гладенька	80	10,6
Округлої форми, опуклі, блискучі, білого кольору, краї рівні. Діаметром 1–1,5 мм, поверхня гладенька	50	16,6
Округлої форми, краї рівні, опуклі, з білими обідками. Діаметром 5 мм, поверхня гладенька	50	3,6
Округлої форми, краї рівні, плоскі, матові, білі. Діаметром 1–5 мм, поверхня гладенька	50	3,6
Неправильної форми, плоскі, матові, жовтуватого кольору. Діаметром 8–10 мм, поверхня шорстка	30	13,4
Округлої форми, опуклі, блискучі, білого кольору з бежоватим валиком по краю, краї рівні. Діаметром 2–3 мм, поверхня гладенька.	10	10,3

У Таблиці 3.2. представлені результати дослідження частоти трапляння і рясності морфотипів бактерій із сім'ядоль і корінців проростків гороху посівного. Тож більшість колоній мали округлу форму, мали опуклий або плаский контур, блискучу або матову поверхню. Відмінності, що були виявлені у всіх досліджених колоній були у кольорі колонії.

У Таблиці 3.3 представлені результати дослідження загальної активності росту бактерій із сім'ядоль і корінців проростків гороху за дії різних температур.

Таблиця 3.3.

**Загальна активність росту бактерій із сім'ядоль і корінців проростків
гороху за дії різних температур**

Температура	Частина рослини, з якої було виділено бактерії		
	Оболонка зерна	Сім'ядолі	Корінці (поверхня)
20°C (контроль)	++	++	+
4°C	++	++	++
45°C	++	+++	+++
50°C	+++	+++	+++
55°C	++++	++++	++

* + слабкий ріст, ++ помірний ріст, +++ рясний ріст, ++++ зливний ріст

Аналіз отриманих результатів показав, що активність росту бактерій різнилася у залежності від температури, впливу якої підлягало насіння. Так, за температури проростання +20°C спостерігали слабкий ріст бактерій, що були виділені з оболонки та поверхні корінців та помірний ріст бактерій з поверхні сім'ядолей. Помірний ріст бактерій був також характерний для варіанту з температурою +4°C для всіх варіантів досліду. Більш високі температури призводили до активного росту бактерій на поживному середовищі. Так, за температури +45°C та +50°C спостерігали рясний ріст бактерій. Температура

+55°C мала значний вплив на ріст бактерій, що були виділені з оболонки та сім'ядолей насіння, проте для бактерій з поверхні корінців активність росту була нижчою.

Результати визначення загального мікробного числа бактерій насіння гороху посівного при культивуванні за різних температур представлені на Рис. 3.12.

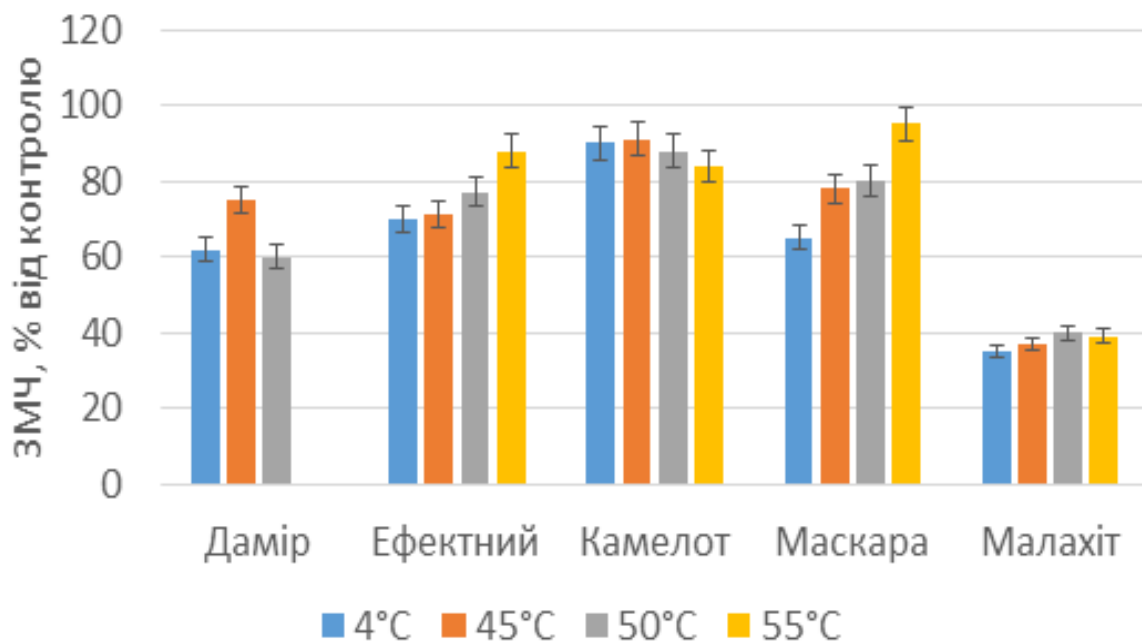


Рис. 3.12. Загальна чисельність бактерій ендосфери насіння різних сортів гороху посівного, % від контролю

Показано, що у варіанті з впливом температури 45°C збільшувалось загальне мікробне число ендосфери насіння гороху сорту Дамір, показники за умов культивування за низької температури та температури 50°C були близькими і склали 60% від контролю. Показники загального мікробного числа бактерій ендосфери насіння гороху посівного сорту Ефектний та Маскара збільшувалися із зростанням температури культивування. Показники загального мікробного числа бактерій гороху посівного сорту Камелот та Малахіт мали

близькі значення у всіх варіантах досліджу. Однак слід відмітити, що насіння сорту Малахит мало найнижчі показники загального мікробного числа у порівнянні з іншими дослідженими сортами гороху посівного.

Таким чином, отриманні дані впливу термостресу на показники проростання та розвиток проростків в умовах термостресу можуть бути використані в моделюванні для імітації сходів за різних умов посіву. Параметри, що досліджувалися також можна використовувати в більш загальному вигляді в моделях росту культур для прогнозування врожайності. Для гороху посівного сортові особливості насіння вплинули на проростання та реакцію росту проростків на дію термостресу. А з огляду на загострення екологічних проблем та скорочення доступних для сільськогосподарського використання земель та водних ресурсів, дослідження реакцій рослин на зовнішні стресори набуває все більшого значення. Розуміння механізмів резистентності та толерантності культурних рослин стає ключем до розробки стратегій для підвищення їх стійкості та продуктивності.

ВИСНОВКИ

1. Короткотривала дія високих температур негативно впливала на процеси проростання насіння досліджуваних сортів гороху посівного: найбільш чутливим до дії високої температури виявилося насіння сорту Дамір. Максимальну жаростійкість було встановлено для насіння сорту Малахит.

2. За короткотривалого впливу високих температур різною мірою пригнічувався розвиток надземної і підземної частин проростків гороху: депресія ростових процесів надземної частини проростків була сильнішою у порівнянні з показниками корінців.

3. За короткотривалого впливу низької позитивної температури відбувалася стимуляція проростання насіння гороху посівного, проте пригнічувалися ростові показники проростків, причому депресія ростових процесів корінців проростків була виразнішою у порівнянні з показниками надземної частини.

4. Високі і низька позитивна температури пригнічували активність амілази у сім'ядолях гороху посівного, причому негативний ефект посилювався протягом перших діб проростання насіння.

5. Насіння досліджуваних сортів різнилося за виявленою бактеріофлорою, проте не встановлено чіткої залежності температурної стресостійкості гороху посівного від загальної чисельності та активності мікробіому сім'ядолей і корінців проростків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреюк, К.І. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження / Андреюк, К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін. – К.: Обереги, 2001. – 240 с.
2. Атраментова, Л. О. Біометрія: підручник для студентів вищих навчальних закладів / Атраментова, Л. О., Утєвська, О. М. – Харків: Ранок, 2007. – 176 с.
3. Алексєєв, О.О. Вплив екологічних факторів на розвиток і продуктивність бобоворизобіального симбіозу // Сільське господарство: Екологія та охорона.-№4 та лісівництво навколишнього середовища. – 2016. – С. 186-197.
4. Гродзинський, Д.М. Адаптивна стратегія фізіологічних процесів рослин. – Київ: Наукова думка, 2013. – 302 с.
5. Гуральчук Ж.З. Значення арбускулярної мікоризи для забезпечення рослин фосфором та іншими елементами живлення. Фосфор і калій у землеробстві. / Гуральчук Ж.З. // Проблеми мікробіологічної мобілізації. Міжнар. науково-практична конф. Наукові доповіді. – Чернігів-Харків, 2004. – С. 31-40.
6. Колупаєв Ю. Є. Особливості метаболізму та захисні функції вуглеводів рослин в умовах стресу. Фізіологія і біохімія культурних рослин. / Колупаєв Ю.Є., Трунова Т.І. – Т. 24, № 6. – 1992. – С. 523-533.
7. Колупаєв, Ю. Є. Стресові реакції рослин: молекулярно-клітинний рівень / Ю. Є. Колупаєв. – Харків: 2001. – 171 с.
8. Колупаєв Ю.Є. Кальцій і стресові реакції рослин. / Ю. Є. Колупаєв. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. – Вип. 1 (10). – 2007. – С. 24-41.

9. Колупаєв Ю. Є. Роль сигнальних систем і фітогормонів у реалізації стресових реакцій рослин / Ю. Є. Колупаєв, І. В. Косаківська // Український ботанічний журнал. – 2008. – Т. 65, № 3. – С. 418-430.
10. Колупаєв Ю. Є. Фізіологія і біохімія культурних рослин. Активні форми кисню при адаптації рослин до стресових температур. / Колупаєв Ю. Є., Карпець Ю.В. – Т. 41, № 2. – 2009. – С. 95-108.
11. Колупаєв Ю. Є. Карпець Ю. В. Формування адаптивних реакцій рослин на вплив абіотичних стресорів. / Колупаєв Ю. Є., Карпець Ю. В. Київ: Основа, 2010. – 352 с.
12. Курдиш І.К. Роль мікроорганізмів у відтворенні родючості ґрунтів // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2009. – Вип. 9. – С. 7-32.
13. Фролов В.В. Діагностика жаростійкості дині за схожістю насіння після прогрівання / Фролов В.В., Чінова Л.Ю. // Таврійський науковий вісник. – 2020. – № 77. – С. 148-153.
14. Мірутенко В.В. Методичний посібник до виконання практичних робіт з курсу «Науково-дослідна робота студентів» / Мірутенко В.В., Демчинська М.І., Симочко Л.Ю. – Ужгород, 2011. – 72 с.
15. Іутінська Г.А. Мікробна трансформація гумусу в умовах екологічної конверсії сільськогосподарського виробництва // Бюл. Ін-ту с.-г. мікробіології. – 1998. – № 2. – С. 3-8.
16. Abdul Rahman, N.S.N. Effects of Abiotic Stress on Soil Microbiome / Abdul Rahman, N.S.N., Abdul Hamid, N.W., & Nadarajah, K. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22.
17. Barzanti R. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*/ Barzanti R., Ozino F., Bazzicalupo M. et al. // Microb. Ecol. – 2007. – V. 53. – P. 306-316.

18. Beales, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2004. – Vol. 3, Issue 1. – P. 1-20.

19. Benhamou N. Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii* and *Pythium ultimum* / Benhamou N., Belanger R.R., Paulitz T.C. // Phytopathology. – 1996. – V. 86. – P. 114-178.

20. Benhamou N. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria / Benhamou N., Kloepper J.W., Quadt-Hallmann A., Tuzun S. // Plant Physiol. – 1996. – V. 112. – P. 919-929.

21. Compant S. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects / Compant S., Duffy B., Nowak J. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 4951-4959.

22. Duffy B. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism / Duffy B., Schouten A., Raaijmakers J.M. // Annu. Rev. Phytopathol. – 2003. – V. 41. – P. 501-538.

23. De Meyer G. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression / De Meyer G., Audenaert K., Hofte M. // Eur. J. Plant Pathol. – 2009. – V. 105. – P. 513-517.

24. De'fago G. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol / G. De'fago // Plant Pathol. – 2003. – V. 42. – P. 311-312.

25. Dubey, A., Malla, M.A., Khan, F., Chowdhary, K., Yadav, S., Kumar, A., Sharma, S., Khare, P.K., Khan, M.L. Soil microbiome: A key player for conservation of soil health under changing climate // Biodiversity and Conservation. – 2019. – Vol. 28. – P. 2405-2429.

26. Frater, P.N., Borer, E.T., Fay, P.A., Jin, V., Knaeble, B., Seabloom, E., Sullivan, L., Wedin, D.A., Harpole, W.S. Nutrients and environment influence arbuscular mycorrhizal colonization both independently and interactively in *Schizachyrium scoparium* // Plant Soil. – 2018. – Vol. 425. – P. 493–506.
27. Gahan, J., Schmalenberger, A. The role of bacteria and mycorrhiza in plant sulfur supply // Frontiers in Plant Science. – 2014. – Vol. 5. – P. 723-739.
28. Gevrekci, A.Ö. The roles of polyamines in microorganisms // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2017. – Vol. 33, Issue 11. – P. 204-214.
29. Glick B.R., Penrose D.M., Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria // J. Theor. Biol. – 2008. – V. 190. – P. 63-68.
30. Glick, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications // Scientifica. – 2012. – Free PMC article.
31. Glick B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria // Can. J. Microbiol. – 2005. – V. 41. – P. 109-117.
32. Goicoechea, N. Mycorrhizal fungi as bioprotectors of crops against Verticillium wilt – A hypothetical scenario under changing environmental conditions // Plants. – 2020. – Vol. 9, Issue 11. – P. 1468.
33. Gray E.J., Smith D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes // Soil Biol. Biochem.– 2005. – V. 37. – P. 395-412.
34. Haas D., Keel C., Reimann C. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties // Antonie Leeuwenhoek. – 2002. – V. 81. – P. 385-395.
35. Holland M.A., Long R.L.G., Polacco J.C. *Methylobacterium spp.*: phylloplane bacteria involved in crosstalk with the plant host? // Phyllosphere microbiology. / Eds. S.E. Lindow, E.I. Hecht-Poinar, V.J. Elliot. – St. Paul, Minn: APS Press, 2002. – P. 125-135.

36. Ibrahim, S., Al-Ahdal, A., Khedr, A., Mohamed, G. Antioxidant α -amylase inhibitors flavonoids from *Iris germanica* rhizomes // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2017. – Vol. 27, Issue 2. – P. 170-174.

37. Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M. et al. Bacterial communities associated with lowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70. – P. 2667-2677.

38. Islam W., Noman A., Naveed H., Huang Z., Chen, H.Y.H. Role of environmental factors in shaping the soil microbiome // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2020. – Vol. 27. – P. 41225–41247.

39. Jerbi, M., Labidi, S., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Chaar, H., Jeddi, F. Ben. Higher temperatures and lower annual rainfall do not restrict, directly or indirectly, the mycorrhizal colonization of barley (*Hordeum vulgare* L.) under rainfed conditions // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15.

40. Kalayu, G. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers // *International Journal of Agronomy*. – 2019. – Vol. 19. – P. 1–7.

41. Keenleyside, W. Microbiology: Canadian Edition // Pressbooks. Toronto, ON, Canada. – 2019. – Chapter 9.6: Temperature and Microbial Growth. – p. 636.

42. Kloepper J.M., Rodrigues-Ubana R., Zehnder G.W. et al. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases // *Aust. Plant Pathol.* – 2009. – V. 28. – P. 21-26.

43. Kumar P.K.R., Lonsane B.K. Microbial production of gibberellins: state of the art // *Adv. Appl. Microbiol.* – San Diego, California: Academic Press, 2009. – 328 p.

44. Lakin-Thomas, Patricia L., Brody, Stuart. 'Circadian Rhythms in Microorganisms: New Complexities' // *Annual Review of Microbiology*. – 2004. – Vol. 58. – P. 489-519.

45. Larmure, A., Munier-Jolain, N.G. High Temperatures During the Seed-Filling Period Decrease Seed Nitrogen Amount in Pea (*Pisum sativum* L.): Evidence for a Sink Limitation // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1608.

46. Leeman M., van Pelt J.A., Denouden F.M. et al. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens* // *Phytopathology*. – 2005. – V. 85. – P. 1021-1027.

47. Loper J.E., Henkels M.D. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 65, No 12. – P. 5357-5363.

48. MacGregor, A.W., MacDougall, F.H., Mayer, Ch., Daussant, J. Changes in levels of α -amylase components in barley tissues during germination and early seedling growth // *Plant Physiol.* – 2004. – V.75. – P. 203-206.

49. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (Eds.). *Brock Biology of Microorganisms* / Illinois: University Inc. – 2002. – ch. 14. – P. 569.

50. Muñoz, P.A., Márquez, S.L., González-Nilo, F.D., et al. Structure and application of antifreeze proteins from Antarctic bacteria // *Microbial Cell Factories*. – 2017. – Vol. 16. – P. 138.

51. Nowak J., Shulaev V. Priming for transplant stress resistance in in vitro propagation // *In Vitro Cell. Dev.Biol. Plant.* – 2003. – V. 39. – P. 107-124.

52. O'Sullivan D.J., O'Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. // *Microbiol. Rev.* – 2002. – V. 56. – P. 662-767.

53. Panoff J.M. Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 / J.M. Panoff, B. Thammavongs, J.M. Laplace et al. // *Cryobiology*. – 1995. – 32. – P. 516-520.

54. Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., van Pelt J.A. et al.. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis // *Plant Cell*. – 2008. – V. 10. – P. 1571-1580.

55. Ping L., Boland W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // Trends Plant Sci. – 2004. – V. 9. – P. 263-269.

56. Raaijmakers J.M., Leeman M., van Oorschot M.M.P. et al. Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. // Phytopathology. – 2005. – V. 85. – P. 1075-1081.

57. Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T. et al. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases // Crop Prot. – 2001. – V. 20. – P. 1-11.

58. Rovira A.D. Interactions between plant roots and soil microorganisms // Ann. Rev. Microbiol. – 2005. – V. 19. – P. 241-266.

59. Samreen, T., Naveed, M., Nazir, M.Z., Asghar, H.N., Khan, M.I., Zahir, Z.A., et al. Seed-associated bacterial and fungal endophytes: Diversity, life cycle, transmission, and application potential // Applied Soil Ecology. – 2021. – Vol. 168. – P. 104191.

60. Sita, K., Sehgal, A., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K.H.M., Nayyar, H. Identification of High-Temperature Tolerant Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Genotypes through Leaf and Pollen Traits // Frontiers in Plant Science. – 2017. – Vol. 8. – P. 744.

61. Siddique, S.; Naveed, M.; Yaseen, M.; Shahbaz, M. (2022). Exploring Potential of Seed Endophytic Bacteria for Enhancing Drought Stress Resilience in Maize (*Zea mays* L.) // Sustainability. – 2022. – Vol. 14, Issue 2. – P. 673.

62. Stupnikova I, Benamar A, Tolleter D, Grelet J, Borovskii G, Dorne AJ, Macherel D. Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures // Plant Physiology. – 2006. – Vol. 140, Issue 1. – P. 326–335.

63. Tolner B., Poolman B., Koning Wil N. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures in the Special section of Comparative

Biochemistry and Physiology Part A // Physiology. – Vol. 118, Issue 3. – 2007. – P. 423-428.

64. Trent J.D. A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea // FEMS Microbiol. Rev. – 1996. – 18. – No 2-3. – P. 249-258.

65. Turgay K. Role of proteolysis and chaperones in stress response and regulation // In G. Storz, R. Hengge (ed). Bacterial stress responses, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC. – 2011. – P. 75-90.

66. Vance C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources // Plant Physiol. – 2001. – V. 127. – P. 390-397.

67. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria // Annu. Rev. Phytopathol. – 2008. – V. 36. – P. 453-483.

68. Ye B., Saito A., Minamisawa K. Effect of inoculation with anaerobic nitrogen-fixing consortium on salt tolerance of *Miscanthus sinensis* // Soil Sci. and Plant Nutr. – 2005. – 51, N 2. – P. 243-249.

69. Weyens N., van der Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J. Phytoremediation: plant-endophyte partnership take the challenge // Curr. Opin. Biotechnol. – 2009. – V. 20. – P. 248-254.

SUMMARY

We studied the effect of high and low temperatures on seed germination, seedling growth rates, amylase activity in cotyledons, and determined the effect of heat stress on the activity and number of endophytic microflora of seed collection varieties of seed pea (*Pisum sativum* L.).

It was established that high temperatures suppress the germination of the seeds of the investigated pea varieties. It was shown that high temperature inhibited the development of above-ground and underground parts of seedlings of the studied pea varieties to varying degrees. The depression of the growth processes of the above-ground part of the seedlings was higher compared to the indicators for the underground part. At low temperature, the germination of pea seeds was stimulated, but the growth processes of the seedlings were inhibited. The depression of the growth processes of the underground part of the seedlings was higher, in comparison with similar indicators for the above-ground part of the seedlings. High and low temperatures inhibited amylase activity in the cotyledons of pea, it was found that during the first 5 days of germination the effect of inhibition increases. The seeds of the researched pea varieties differed in terms of the total number of microorganisms and their activity. However, no significant dependence of the activity of the seed microbiome of the investigated pea varieties on the effects of thermostress was found.

Key words: thermostress, seeds of field pea, *Pisum sativum* L., growth processes, amylase activity, endophytic microflora.