

11. Analiz zbrudnennja atmosferi povitrja pilkom ambrozii protjagom 2006-2011 rokiv / G. Ju. Maleeva, O.B. Prihod'ko, M.V. Stebljuk, T.I. Єmec' // Zaporozhskij medicinskij zhurnal. – 2012. – № 5 (74). – S. 38-40.
12. Rodinkova V.V. Zakonomirnosti pilkuvannja ta tendencii rozpovsjudzhennja alergennoi Ambrosia v Ukraini / V.V. Rodinkova // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2012. – № 19. – S. 100-106.
13. Biogeographical estimates of allergenic pollen transport over regional scales: Common ragweed and Szeged, Hungary as a test case / [L. Makra, I. Matyasovszky, G. Tusnady et all.] // Agricultural and Forest Meteorology – 2016. – Vol. 221. – P. 94-110.
14. Airborne Pollen Grains In Bursa, Turkey, 1999-2000 / [A. Bicakci, S. Tatlidil, N. Sapan et all.] // Ann Agric Environ Med. – 2003. – № 10. – R. 31–36.
15. Maleeva G.Ju. Ocinka terminiv cvitinnja alergennih anemofil'nih roslin za dopomogoju kros-koreljacijnoi funkcii / G.Ju. Maleeva, O.B. Prihod'ko, T.I. Єmec' // Zaporozhskij medicinskij zhurnal. – 2012. – № 4 (73). – S. 109-111.
16. Frenguelli G. Airborne pollen sampling techniques / G. Frenguelli, G. D'Amato, S. Bonini, S.R. Durham // Pollenosis 2000: Global approach. – 2001. – P. 83-90.

УДК 579.674

## **ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ОНУ 12 І *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* C58 НА ПРОРОСТАННЯ І ДЕЯКІ РОСТОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАРОСТКІВ ТОМАТА**

Масловська Н.С., Ліманська Н.В.

*Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова*

*65082, Україна, Одеса, вул. Дворянська, 2*

limanska@gmail.com

Обробка насіння томата сорту Балада бактеріями штама *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 підвищувала енергію проростання на 15%, середню довжину кореня паростка – на 13%, а обробка безклітинною культуральною рідиною цього штама збільшувала схожість на 21,2%. На етапі проростання насіння томата фітопатоген *Agrobacterium tumefaciens* C58 не чинив видимого негативного впливу, натомість, безклітинна культуральна рідина підвищувала схожість на 13%, а середню довжину кореня паростків – на 7%. Виражений стимулюючий ефект спостерігався у випадку обробок насіння сумішшю клітинних суспензій лактобацил і патогенних агробактерій: збільшення схожості на 27,1%, середньої довжини надземної частини – на 11%. Якщо до культур додавали культуральну рідину іншого мікроорганізму, також спостерігалася стимуляція проростання (14,5-17,2%). Явище підвищення стимулюючої активності лактобацил за індукції іншим мікроорганізмом описано нами уперше.

*Ключові слова: біологічні препарати, стимуляція схожості й росту рослин, молочнокислі бактерії, збудник бактеріального раку.*

Масловская Н.С., Лиманская Н.В. ВЛИЯНИЕ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ОНУ 12 И *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* C58 НА ПРОРАСТАНИЕ И НЕКОТОРЫЕ РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОРОСТКОВ ТОМАТА / Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова; 65082, Украина, Одесса, ул. Дворянская, 2

Обработка семян томата сорта Баллада бактериями штамма *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 увеличивала энергию прорастания на 15%, среднюю длину корня проростка – на 13%, а обработка безклеточной культуральной жидкостью данного штамма повышала всхожесть на 21,2%. На этапе прорастания семян томата фитопатоген *Agrobacterium tumefaciens* C58 не причинял видимого негативного влияния, наоборот, безклеточная культуральная жидкость повышала всхожесть на 13%, а среднюю длину корня проростка – на 7%. Выраженный стимулирующий эффект наблюдался в случае обработок семян смесью клеточных суспензий лактобацилл и патогенных агробактерий: увеличение всхожести на 27,1%, средней длины надземной части – на 11%. Если к культурам добавляли культуральную жидкость другого микроорганизма, то также наблюдалась

стимуляция проростания (14,5-17,2%). Явление увеличения стимулирующей активности лактобацилл в результате индукции другим микроорганизмом описано нами впервые.

*Ключевые слова:* биологические препараты, стимуляция всхожести и роста растений, молочнокислые бактерии, возбудитель бактериального рака.

Maslovska N.S., Limanska N.V. EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU 12 AND *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* C58 ON GERMINATION AND SOME GROWTH CHARACTERISTICS OF TOMATO SEEDLINGS / Odessa National I.I. Mechnikov University; 65082, Ukraine, Odessa, Dvorianska str., 2

Tomatoes are the common plants used for the study of crown gall pathogenesis and testing of biological preparations. It is a model object with fast manifestations of crown gall symptoms. Modelling of infection is routinely carried out by injections in stems or via soaking roots in phytopathogen suspensions or planting in infested soil. It has not been studied yet how the phytopathogenic agrobacteria, for instance – from infected soil, effect on tomato seeds germination and growth characteristics of seedlings.

Lactobacilli are the perspective microorganisms for plant protection and stimulation of plant growth. Recently we revealed for the first time the possibility of inhibition of crown gall agent *Agrobacterium tumefaciens* with antagonistic *Lactobacillus plantarum*.

Taking into account all the mentioned above, the aim of our work was to study the effect of *L. plantarum* and *A. tumefaciens* on germination and some growth characteristics of tomato seedlings.

*L. plantarum* ONU 12 was selected as a strain with effective inhibition of *A. tumefaciens* under laboratory and green house conditions. Lactobacilli were cultivated overnight in MRS medium at 37°C. Phytopathogens *A. tumefaciens* C58 were cultivated overnight in LB medium at 28°C. Bacterial cells from overnight cultures were washed three times by centrifugation (10 000 g 20 min) and after the pellets were diluted by sterile distilled water till the initial concentration of  $2 - 3 \times 10^9$  CFU/ml. The seed surfaces were sterilized by 25% hydrogen peroxide for 5 sec and after washed three times in sterile distilled water. Seeds were soaked in bacterial suspensions, supernatants or in the controls for 6 hours and left in sterile wet camera for germination at 25°C. The next variants of treatments were used: bacteria of *L. plantarum* ONU 12 strain washed from the cultural liquid; cell free cultural liquid of *L. plantarum* ONU 12 (supernatant after centrifugation); bacteria of *A. tumefaciens* C58 strain washed from the cultural liquid; supernatant of agrobacterial overnight culture; mixture of cell suspensions of both strains in 1:1 ratio; cell free supernatants of both strains mixed in 1:1 ratio; bacteria *L. plantarum* ONU 12 and supernatant of agrobacteria; bacteria *A. tumefaciens* C58 and supernatants of *L. plantarum* ONU 12. Water, nutritional media and their mixtures were the negative controls. Eight independent experiments with 50 seeds in each variant of the treatment (400 seeds per variant totally) were carried out. Energy of germination was calculated on 6th day; germination, mean lengths of roots and stems of seedlings were measured on 12th day.

The treatment of tomato seeds cv Ballada by the bacteria of *L. plantarum* ONU 12 strain increased the energy of germination in 15%, the mean length of seedling roots in 13%, and the treatment by cell free cultural liquid of this strain increased the germination in 21,2%.

The phytopathogen *A. tumefaciens* C58 on the stage of germination didn't affect seeds negatively, opposite – the cell free cultural liquid increased the germination in 13% and mean length of seedling roots in 7%. Stimulating effect of agrobacterial metabolites needs further investigations.

Bacterial suspensions of *A. tumefaciens* C58 slightly decreased the mean root lengths of the tomato seedlings.

The significant stimulating effect was observed in case of the treatment of seeds with the mixture of cell suspensions of lactobacilli and pathogenic agrobacteria: germination increased in 27,1%, mean length of stems – in 11%. If the bacterial cultures were mixed with the cultural supernatants of the another microorganism, the stimulation of germination also occurred (in 14,5-17,2%). It seems that the cultural liquid of another microorganism (*A. tumefaciens* C58 in our case) plays a role of inductor which improves the stimulating properties of lactobacilli.

The effect of increasing the plant stimulation activity of lactobacilli by induction of another microorganism has been described for the first time.

*Key words:* biological preparations, stimulation of germination and plant growth, lactic acid bacteria, crown gall agent.

## ВСТУП

Розробки ефективних біологічних препаратів для захисту рослин від фітопатогенів, наприклад, від збудника бактеріального раку, потребують добору зручних модельних систем. Фітопатоген *Agrobacterium tumefaciens* спричиняє захворювання на бактеріальний рак на коріннях та стеблах томатів [10], але для однорічних рослин шкідливість захворювання не така висока, як для багаторічних. Тому томат у цьому випадку є не стільки як рослиною, яку потрібно захистити від бактеріального раку, а модельним об'єктом, на якому швидко з'являються симптоми бактеріального раку. Штучне інфікування томата проводять зазвичай методом ін'єкцій у стебло або через коріння, витримане в суспензії фітопатогену, або висаджене в інфікований ґрунт [6]. Дотепер не було вивчено, як вплив фітопатогенних агробактерій, наприклад, з інфікованого ґрунту, відображається на схожості насіння томатів і ростових характеристиках сіянців.

Бактерії роду *Lactobacillus* є перспективними мікроорганізмами для захисту від фітопатогенів, а також для стимуляції росту рослин [4]. Було показано інгібуючий вплив лактобацил на фітопатогенні гриби і бактеріальні фітопатогени [5; 9]. Нещодавно нами уперше було показано пригнічення збудника бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens* [7].

З огляду на зазначене метою роботи є вивчення впливу бактерій *Lactobacillus plantarum* та *A. tumefaciens* на проростання насіння томата та деякі морфометричні показники паростків.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для обробки насіння томатів сорту Балада застосовували добову культуру штаму *L. plantarum* ОНУ 12, який було обрано для досліджень як такий, що ефективно пригнічував ріст фітопатогену *Agrobacterium tumefaciens* С58 на щільних і в рідких живильних середовищах. Лактобацили культивували добу в рідкому поживному середовищі MRS [2] при 37°C до досягнення концентрації  $2-3 \times 10^9$  КУО/мл. Фітопатоген *A. tumefaciens* С58, використаний у дослідженні, був люб'язно наданий доктором біологічних наук Ф.І. Товкачем. Для постановки експеримента агробактерії вирощували добу в бульйоні LB [1] при 28°C.

Клітини бактерій з добових культур тричі відмивали центрифугуванням від залишків середовища (10 000 g протягом 20 хв), а потім доводили в стерильній дистильованій воді (СДВ) до концентрацій  $2-3 \times 10^9$  КУО/мл. Перед обробкою поверхню насіння стерилізували за допомогою розчину перексиду водню 25% протягом 5 с., після чого насіння тричі споліскували у СДВ. У підготовлених суспензіях насіння витримували 6 годин, потім переносили в стерильні вологі камери зі стерильною водою з водогону для проростання при температурі 25°C. Контролем було насіння, замочене на 6 годин у СДВ.

Для визначення дії штамів фітопатогену та лактобацил на проростання насіння томата окремо один від одного та разом було закладено такі варіанти експерименту: бактерії штаму *L. plantarum* ОНУ 12, відмиті від живильного середовища; безклітинна культуральна бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ 12 (супернатант, отриманий після центрифугування); бактерії штаму *A. tumefaciens* С58, відмиті від живильного середовища; безклітинна культуральна бактерій штаму *A. tumefaciens* С58; суспензії клітин обох штамів у суміші в однаковій кількості; безклітинна культуральна рідина *L. plantarum* ОНУ 12 та *A. tumefaciens* С58 в однакових співвідношеннях; безклітинна культуральна рідина *L. plantarum* ОНУ 12 та суспензія клітин *A. tumefaciens* С58 в однакових співвідношеннях; безклітинна культуральна рідина *A. tumefaciens* С58 та суспензія клітин *L. plantarum* ОНУ 12 в однакових співвідношеннях; стерильне живильне середовище MRS; стерильне

живильне середовище LB; стерильне живильне середовище LB та СДВ в однакових співвідношеннях; СДВ. Останні чотири варіанти були негативними контролями.

Усього здійснено 8 незалежних повторностей, кожна – по 50 насінин. Енергію проростання визначали через 6 днів, а схожість – через 12 згідно з загальноприйнятою. На 12-й день також були вимірювали довжину стебел і коренів паростків. Математично результати досліджень лбробляли за допомогою програм Microsoft Excel.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Використання бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ 12 може бути перспективним для обробок насіння томата, оскільки лактобацили як антагоністи пригнічують розвиток патогенів, і окрім того, значно покращують схожість насіння [5]. Цікавим є дослідження впливу збудника бактеріального раку на посівні якості насіння рослин-господарів у комплексі з бактеріями-антагоністами – лактобацилами.

У результаті досліджень показано, що безклітинні культуральні рідини фітопатогену й лактобацил у суміші призвели до підвищення енергії проростання на 16%, а суміш суспензій клітин у такому ж співвідношенні – на 7%. Суспензія клітин лактобацил підвищувала енергію проростання насіння томата сорту Балада на 15% (рис. 1).

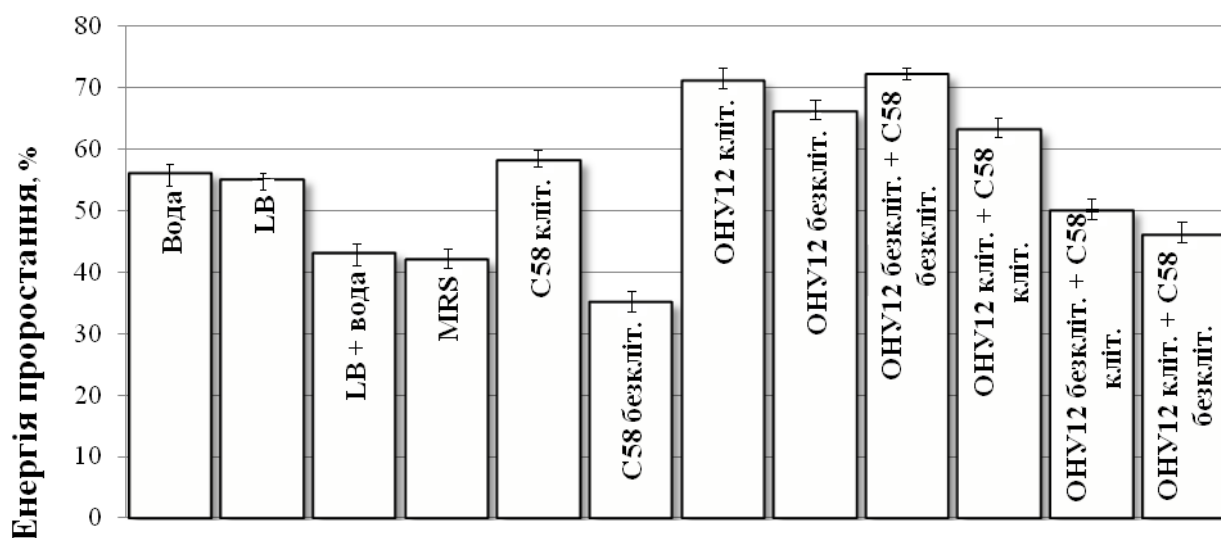


Рис. 1. Енергія проростання насіння томата сорту Балада після обробок бактеріальними суспензіями й контролями поживних середовищ.

Виявилося, що самі по собі відмиті живі культури бактерій так само незначно підвищували й схожість насіння. Так, відмиті клітини *L. plantarum* ОНУ 12 підвищували схожість лише на 4% (рис. 2).

Супернатанти, як *L. plantarum* ОНУ 12, так і *A. tumefaciens* C58, спричиняли більш вагомий вплив на проростання рослин (21,2% і 13%, відповідно). Суміш супернатантів мала менший ефект (10,4%). Натомість суміш живих культур дала найкращий результат стимуляції проростання (27,1%). Якщо ж до живих культур додавати культуральну рідину іншого мікроорганізму, також спостерігається стимуляція проростання (14,5-17,2%), тобто надосадова рідина виступає індуктором, який покращує стимулюючі властивості бактерій. У *L. plantarum* таке явище відоме для синтезу бактеріоцинів, коли ці антагоністичні сполуки синтезуються краще, або навіть винятково – у присутності іншого мікроорганізму-індуктора [8].

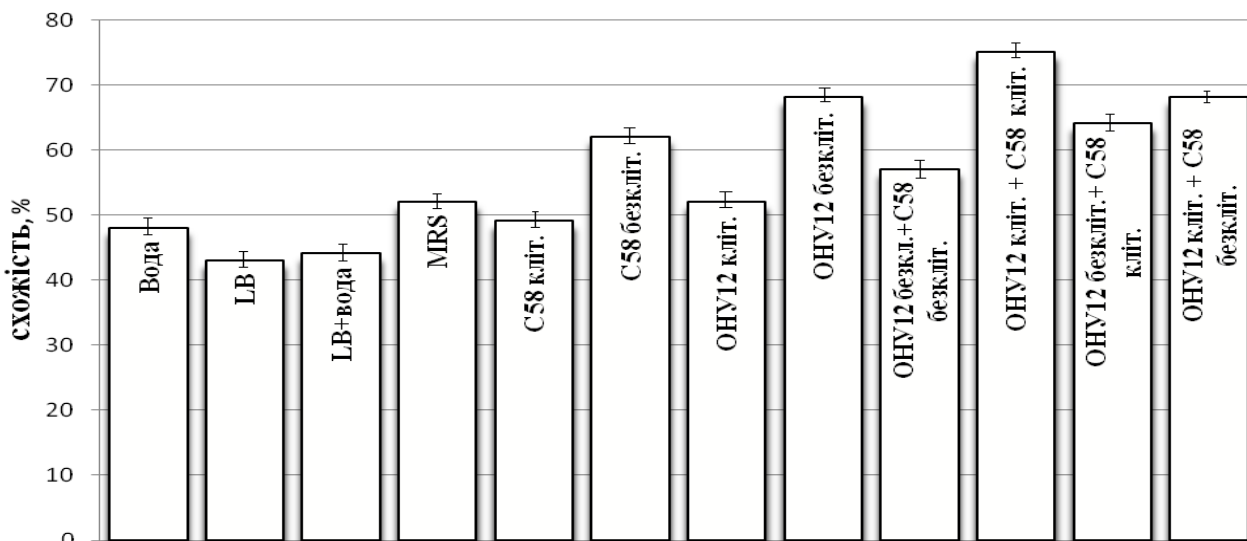


Рис. 2. Схожість насіння томата сорту Балада після обробок бактеріальними суспензіями й контролями поживних середовищ

Лише в одній праці описано можливість синтезу лактобацилами гормонів або гормоноподібних сполук [3], але сам процес синтезу не описується. Можливо, у нашому випадку ми також маємо справу з індукцією або покращенням синтезу невідомих сполук зі стимулюючою дією на проростання рослин.

Щодо середньої довжини надземної частини паростків, вона збільшувалася при обробках сумішшю клітин *L. plantarum* OHU 12 та *A. tumefaciens* C58 на 11% (рис. 3).

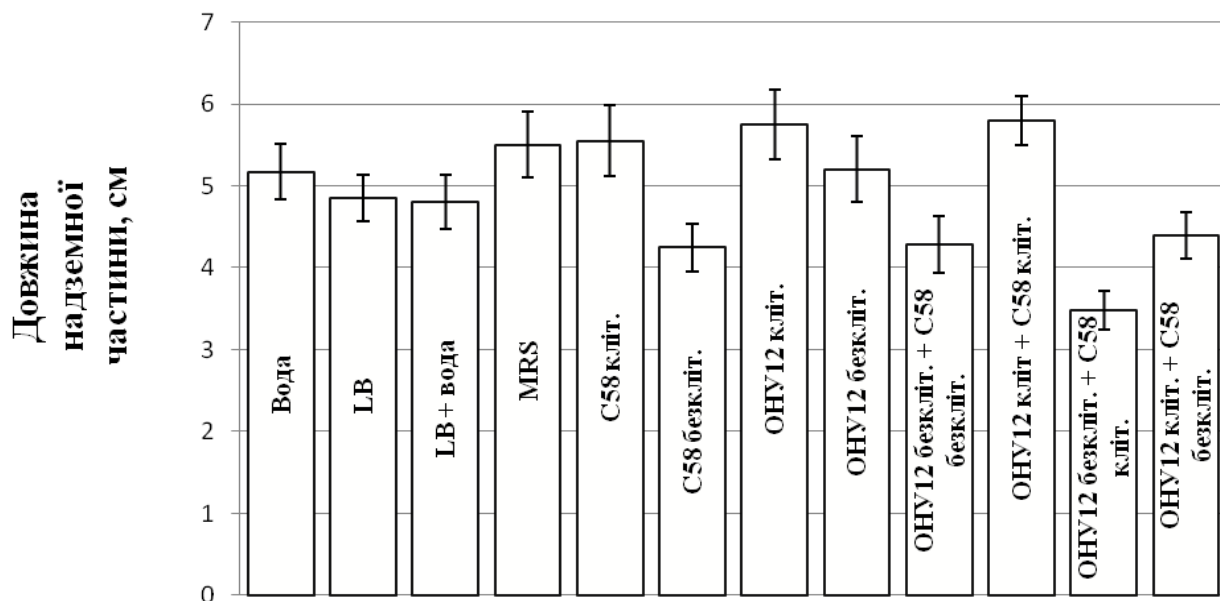


Рис. 3. Довжина надземних частин паростків томата сорту Балада

Самі ж по собі клітини фітопатогену зменшували середні довжини коренів проростків (рис. 3, рис. 4).

На середню довжину кореня паростків томата обробки сумішшю клітин *L. plantarum* OHU 12 та *A. tumefaciens* C58 істотно не впливали – цей показник статистично не відрізнявся від контрольного. Найкращий ефект на збільшення довжини коріння мали обробки клітинною суспензією лактобацил (покращення на 13%) і безклітинною культуральною рідиною фітопатогена (7%).

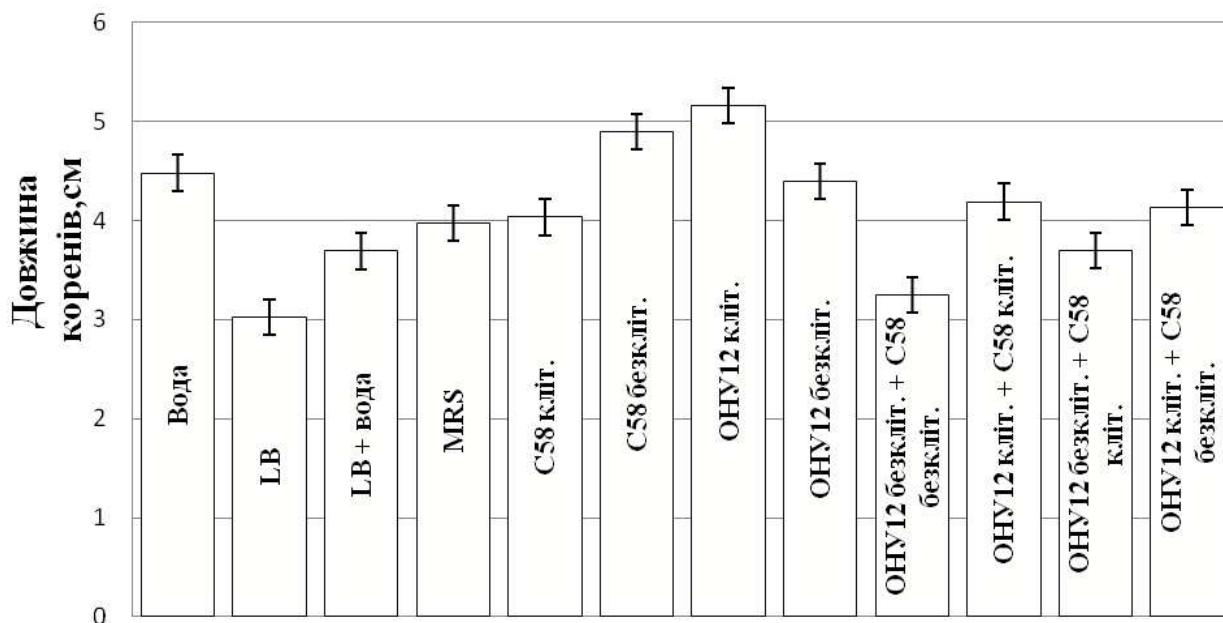


Рис. 4. Довжина коренів паростків томата сорту Балада

Отже, залежно від того, чи застосовувалася клітинна суспензія *A. tumefaciens* C58 або безклітинна надосадова рідина цих бактерій, вплив на проростання та ростові характеристики паростків томата відрізнявся і міг бути і пригнічувальним, і дещо стимулюючим. Стимулюючий вплив метаболітів агробактерій на ріст кореня та схожість насіння томата потребує подальшого дослідження. Вираженого негативного впливу на насіння і паростки (гниття, некрози, в'янення тощо) на цьому етапі розвитку рослини томата фітопатоген не спричиняв. Позитивний ефект обробок лактобацилами для захисту рослин від фітопатогенів було описано деякими авторами, наприклад, щодо захисту томатів від *Fusarium oxysporum*, і цей вплив був штамоспецифічним [5]. Нами в результаті дослідження було уперше описано здатність суміші патогенних агробактерій та лактобацил спричиняти стимулюючий вплив на проростання та сіянці, а саме – на схожість, енергію проростання, середню довжину стебел.

Необхідними є подальші дослідження консорціумів представників мікробіоти рослин для виявлення складних міжвидових взаємодій, які можуть відобразитися на дії біологічних препаратів, введених у природний агроценоз.

## ВИСНОВКИ

1. Інокуляція насіння сорту Балада суспензіями штаму *L. plantarum* ОНУ 12 підвищувала схожість на 4%, енергію проростання – на 15%, середню довжину коренів – на 13%.
2. Фітопатоген *A. tumefaciens* C58 не спричиняв видозмін насіння і паростків томата, натомість безклітинна культуральна рідина штаму підвищувала схожість на 13%, а середню довжину кореня паростків – на 7%.
3. Уперше показано виражений стимулюючий ефект у випадку обробок насіння сумішами лактобацил і патогенних агробактерій. Схожість насіння томата збільшувалась на 27,1%.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* / G. Bertani // *Journal of Bacteriology*. – 1951. – Vol. 62. – P. 293-300.

2. De Man J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. De Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1960. – Vol. 23. – P. 130-135.
3. Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth / P. Goffin, B. De Bunt, M. Giovane, et al. // *Molecular Systems Biology*. – 2010. – Vol. 6. – Режим доступу : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/msb.2010.67/full>
4. Higa T. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation / T. Higa, S. Kinjo // *Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand*. – 1989. – P. 140-147.
5. Hoda A.H. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant / A. H. Hoda, A. M. Yomna, M. A.-A. Shadia // *Life science J*. – 2011. – Vol. 8. – P. 462-468.
6. Kawaguchi A. Biological control of crown gall of grapevine, rose, and tomato by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1/ A. Kawaguchi, K. Inoue, Y. Ichinose // *Phytopathology*. – 2008. – Vol. 98. – P. 1218-1225.
7. Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* / N. Limanska, N. Korotaeva, V. Biscola, et al. // *Plant Pathology and Microbiology*. – 2015: doi:10.4172/2157-7471.10002. – Режим доступу : <http://www.omicsonline.org/open-access/study-of-the-potential-application-of-lactic-acid-bacteria-in-the-control-of-infection-caused-by-agrobacterium-tumefaciens-2157-7471-1000292.php?aid=59916>
8. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must / B. Rojo-Bezares, Y. Saenz, L. Navarro et al. // *Food Microbiol*. – 2007. – Vol. 24. – P. 482-491.
9. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi / R. Trias, L. Baneras, E. Montesinos, E. Badosa // *International Microbiology*. – 2008. – Vol. 11. – P. 231-236.
10. Tzfira T. *Agrobacterium: from biology to biotechnology* / T. Tzfira, V. Citovsky. – New-York : Springer, 2008. – 750 p.

УДК 502.75

## РАРИТЕТНА КОМПОНЕНТА ПРИРОДНОЇ ФЛОРИ ВИЩИХ СУДИННИХ РОСЛИН о. ХОРТИЦЯ

Охріменко С.Г., Василенко С.В., <sup>1</sup>Шелегеда О.Р.

*Національний заповідник «Хортиця»  
69017, Україна, Запоріжжя, вул. Старого Редуту, 9*

<sup>1</sup>*КЗ «Центр туризму» ЗОР  
69091, Україна, Запоріжжя, вул. Немировича-Данченка, 46-А  
svet-lana2006@ukr.net  
info\_turcenter@ukr.net*

Раритетна компонента природної флори вищих судинних рослин о. Хортиця представлена 248 видами занесеними до охоронних списків різного рангу. У тому числі, 194 види охороняються на міжнародному рівні. До Європейського червоного списку (2011) внесено – 150 видів рослин, до бази