



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121195** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/28 (2020.01)

A01P 21/00

C12R 1/465 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

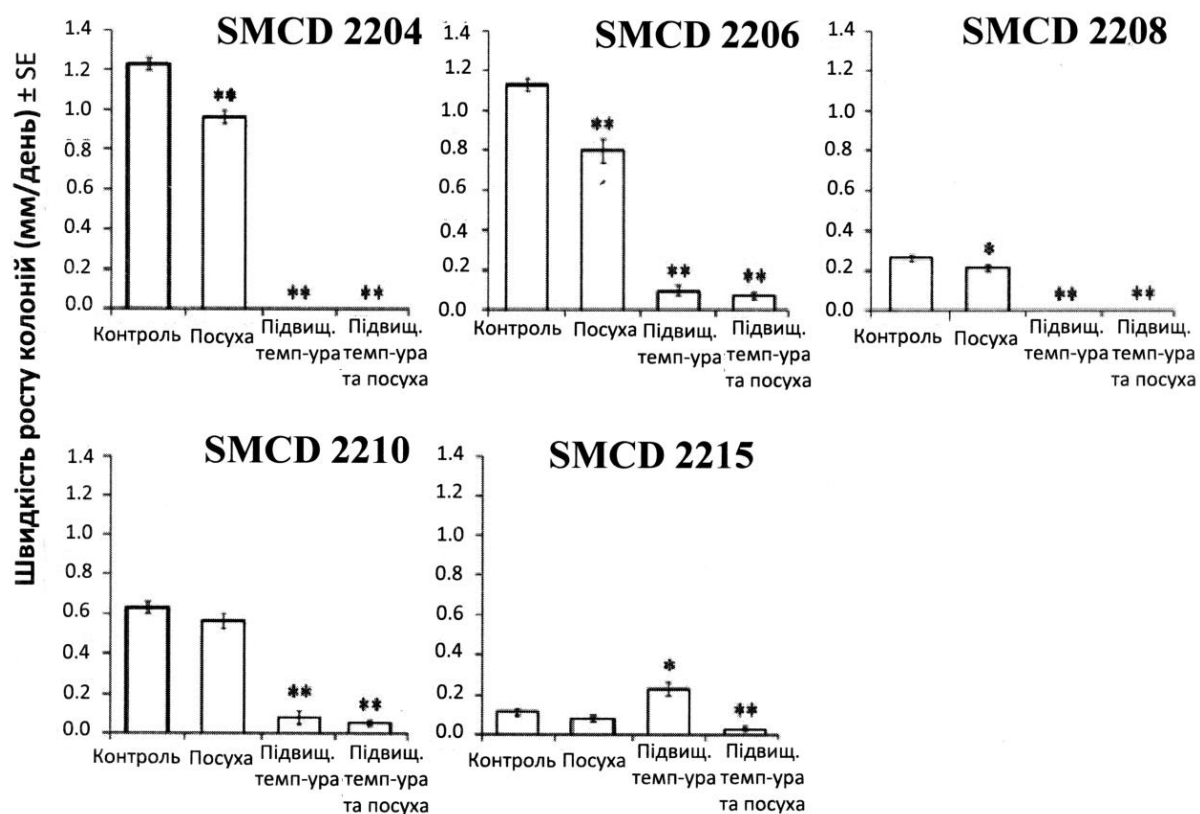
(21) Номер заявки:	а 2015 08515	(72) Винахідник(и):	Вуянович Владімір (СА), Герміда Джеймс Дж. (СА)
(22) Дата подання заявки:	05.02.2013	(73) Власник(и):	ЮНІВЕРСИТЕТ ОФ САСКАТЧЕВАН, Industry Liaison Office, 250-15 Innovation Boulevard, Saskatoon, Saskatchewan S7N 2X8, Canada (CA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	27.04.2020	(74) Представник:	Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.03.2016, Бюл.№ 6	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	HUBBARD, M. et al. Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. BOTANY. 09.02.2012, Vol. 90, no. 2, P. 137-149 TOKALA, R.T. et al. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving <i>Streptomyces</i> <i>lydicus</i> wyec108 and the pea plant (<i>Pisum</i> <i>sativum</i>). Applied and environmental microbiology. 2002, Vol. 68, no. 5, P. 2161- 2171 MA, Y. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. BIOTECHNOLOGY ADVANCES. 13.01.2010, Vol. 29, no. 2, P. 248-258 WO 2007107000 A1, 27.09.2007 US 2012144533 A1, 07.06.2012 WO 2005003328 A1, 13.01.2005
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.04.2020, Бюл.№ 8		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/СА2013/000091, 05.02.2013		

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЕНДОФІТА АБО ЙОГО КУЛЬТУРИ ДЛЯ ОБРОБКИ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР

(57) Реферат:

Винахід стосується застосування ендоефітного штаму *Streptomyces* sp. IDAC 081111-06 або його культури, або штаму, який містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6, яке включає обробку насіння злакової культури ендоефітом або його культурою та культивування насіння злакової культури до рослини першого покоління, для підвищення біомаси кореневих волосків злакових культур, для підвищення довжини листя злакових культур, для підвищення врожайності злакових культур та для підвищення протидії патогенам злакових культур.

UA 121195 C2



Фіг. 15

Галузь техніки

Даний винахід відноситься до грибкових та бактеріальних ендоефітів рослин, які підвищують виживаність насіння та/або підсилюють здоров'я рослин, приводячи до загального поліпшення сільськогосподарських характеристик рослин у нормальних та стресових умовах. Також винахід відноситься до таких ендоефітів в ізолюваному стані.

Рівень техніки

Гриби і бактерії являють собою мікроорганізми-космополіти. Термін "ендоефіт" вперше запропонований deBary [1866] для позначення мікробів, здатних безсимптомно колонізувати рослинні тканини [Stone et al., 2000]. Про існування ендоефітів відомо протягом вже більш ніж сторіччя [Freeman 1904], і, мабуть, в кожному окремо обраному з 300000 видів рослин-хазяїв мешкає від декількох до сотень ендоефітів [Tan та Zou, 2001]. Ендоефіти являють собою мікроорганізми, які пов'язані з живими тканинами рослин-хазяїв переважно симбіотичними або мутуалістичними відносинами. Багато з них здатні підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресових факторів або можуть використовуватися рослиною для захисту від патогенних грибів і бактерій [Singh et al. 2011]. Деякі з цих мікроорганізмів виявилися корисними для сільського господарства, лісового господарства та садівництва, а також як і рослини для виробництва важливих медичних сполук.

Ендоефіти в значній мірі детермінують процеси регуляції в рослинних клітинах та в цілому геномі рослини, у тому числі життєвий цикл рослини: (i) процеси, що відбуваються до та після проростання насіння (міковіталізм) [Vujanovic i Vujanovic 2007], (ii) поглинання поживних речовин рослиною і механізми стимуляції росту (мікогетеротропізм) [Smith i Read 2008] і (iii) несприйнятливості рослин до стресу, зумовленого впливом навколишнього середовища та індукованої системної стійкості до хвороб і шкідників (мікосимбіотицизм) [Wallin 1927; Margulis, 1991]. Вони можуть відігравати важливу роль у формуванні біомаси рослинами, поглинання CO₂ та/або зміни врожайності та, отже, мають важливе значення в регуляції екосфери, забезпечуючи здоров'я рослин і продовольчу безпеку. Крім того, вони можуть бути важливими детекторами (біоіндикаторами) змін навколишнього середовища, так, наприклад, зміни структури та біомаси ендоефітних спільнот можуть передбачати зміни не тільки в шляхах надходження нутрієнтів (N, P, K), передачі енергії у харчових ланцюгах і біогеохімічних циклах, але і в змінах стійкості до ультрафіолету (УФ-В), підвищеної температури, посухи та засолення, які впливають на формування і загальну стабільність рослинних екосистем. Незважаючи на велику кількість і, мабуть, значущість у всіх наземних екосистемах, майже нічого не відомо про склад ендоефітів насіння або спермосфери, взаємозв'язків між ними та їхньої загальної відповідної реакції на зміни навколишнього середовища.

Спермосфера являє собою швидко мінливу та мікробіологічно динамічну зону ґрунту, що оточує проростаюче насіння [Nelson, 2004], тимчасом як різосфера являє собою мікробіологічно активну зону ґрунтової маси, яка оточує коріння рослин [Smith та Read 2008]. Різосфера підтримує мікогетеротрофію або симбіотичні відносини міжкориза-рослина. Спермосфера, з іншого боку, сприяє формуванню міковітальності або взаємовідносинам між ендоефітними грибами та насінням рослин, що збільшують силу, енергію і дружність проростання насіння, значення чого може бути досить прогнозованим. Грибкові ендоефіти відрізняються від мікоризи тим, що можуть колонізувати не тільки коріння, але й інші органи рослин, включаючи насіння [Vujanovic et al. 2000; Hubbard et al. 2011]. Вони належать до відділів багатоклітинних грибів Ascomycota та Basidiomycota, та форма здійснюваної ними колонізації симбіотичних структур відрізняється від тієї, яку формують одноклітинні або ценоцитні представники відділу Glomeromycota, відомої як везикулярно-арбускулярний мікорізний симбіоз [Abdellatif et al. 2009]. Ендоефітні бактерії були також знайдені практично в кожній вивченій рослині, де вони займають екологічну нішу, подібну ніші грибів, таку як, наприклад, в здорових внутрішніх тканинах. Хоча більшість бактерій-ендоефітів, мабуть, починають свій життєвий цикл у різосфері або філосфері; деякі з них можуть передаватися з насінням [Ryan et al. 2008].

Проростання насіння являє собою надзвичайно важливий етап життєвого циклу для розмноження і виживання рослин при оптимальних і стресових умовах навколишнього середовища. Колонізація мікробами-ендоефітами на стадії насіння є особливо критичною, тому що насіння виконує роль органу розмноження квіткових рослин, важливого для їхнього відновлення та поширення [Baskin i Baskin 2004] та внаслідок виконуваної мікобіонтами та симбіотичними асоційованими бактеріями (бактобіонтами) ролі потенційних активаторів запуску проростання у природному – необуреному, обуреному або забрудненому – середовищі існування [Mühlmann i Peintner 2000; Adriaensen et al. 2006; White i Torres 2010]. Таким чином, важливо розробляти способи, за допомогою яких можна підвищити схожість і перешкоджати її обмеженню впливом хвороб, спекою або посухою. Використання ендоефітних симбіонтів являє

собою перспективний спосіб, за допомогою якого може бути підвищена схожість насіння. [Vujanovic et al. 2000; Vujanovic та Vujanovic 2006; Vujanovic та Vujanovic 2007]. Було висловлено припущення, що стресостійкість рослин можна забезпечити за допомогою відносин між мікобіонтами та насінням, відомих як міковітальність – явища, виявленого у сімействі Orchidaceae [Vujanovic 2008] і за допомогою бактовітальності, яка являє собою форму бактосимбіозу, шляхом використання різних штамів ендоефітів, діючих різними способами.

Суть винаходу

Ендоефіти можуть приносити користь рослинам-хазяїнам, таким як пшениця, ячмінь, бобові, рапс, дерева, кущі або трав'янисті рослини різними способами, в тому числі і шляхом бактовітальності, міковітальності та мікогетеротрофії, підвищуючи їхню стійкість до екологічних стресів, як це вже було показано в даному документі. Пренатальний догляд у землеробстві, як було вже показано на шести ендоефітних штаммах, визначає набагато більше, ніж просто життєздатність, здоров'я і силу насіння або проростків. Він також визначає, чого очікувати до і під час процесу проростання, формування проростків та надалі від продуктивності врожаю або врожайності.

Ряд параметрів симбіотичної ефективності (вихід зі стану спокою, проростання, ріст і врожайність) оцінювали при взаємодії відповідного ендоефітного штаму (штамів) з Saskatchewan Microbial Collection and Database (SMCD) з культурою (культурами) *in vitro* у фітотроні, оранжереї та польових умовах.

Також була перевірена здатність бактеріальних ендоефітів підвищувати життєздатність насіння. Як у випадку з грибами, так і з бактеріальними ендоефітами, покращена життєстійкість насіння може підвищувати стійкість рослин до абіотичних та біотичних стресових факторів на стадії проростання і до дозрівання рослини завдяки мікогетеротрофії.

Відповідно, у даному винаході запропонований ізолюваний штам ендоефіта *Streptomyces* sp. або його культура, яка зберігається в International Depositary Authority of Canada (IDAC, Національна мікробіологічна лабораторія. Агентство суспільної охорони здоров'я Канади. 1015 Арлінгтон стріт, Вінніпег, Манітоба, Канада R3E 3R2), шифр доступу 081111-06, або який містить послідовність 16S рДНК, яка представлена в SEQ ID NO: 6; ізолюваний штам ендоефітів *Parasponyothirium* sp., або його культуру, що зберігається IDAC під шифром доступу 081111-03, або який містить послідовність ITS рДНК, , яка представлена в SEQ ID NO: 5; ізолюваний ендоефіт *Pseudeurotium* sp. або його культуру, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-02 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 4; ізолюваний ендоефіт *Penicillium* sp. або його культуру, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-01, або який містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 03; ізолювану культуру *Cladosporium* sp., яка зберігається під шифром доступу IDAC 200312-06 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 1, та/або виділений ендоефіт *Cladosporium* sp. або його культуру, яка зберігається під шифром доступу IDAC 200312-05 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 2.

Також у даному документі пропонується композиція, що містить ізолюваний ендоефіт або культуру, яка представлена в даному документі, або їхню комбінацію, або їхню суміш з носієм.

Додатково в даному документі пропонується насіння, що містить ендоефіти або культури, які описані в даному документі. В одному з варіантів реалізації винаходу насіння покрито ендоефітами. В іншому варіанті реалізації винаходу насіння культивується або висаджується поряд з ендоефітами таким чином, щоб ендоефіти могли колонізувати насіння.

У даному винаході також пропонуються способи підвищення життєздатності насіння та покращення здоров'я рослини, і підвищення врожайності при нормальних та стресових умовах. Отже, в ньому пропонується спосіб поліпшення життєздатності насіння і здоров'я рослини та/або підвищення врожайності рослини, що включає наступні етапи: інокуляцію насіння ендоефітами чи культурою, яка описана в даному документі, або їхньою комбінацією, або їхньою сумішшю з композицією, яка описана в даному документі та вирощування з насіння рослини першого покоління.

В одному з варіантів реалізації винаходу, спосіб включає наступні етапи: інокуляція насіння ізолюваним ендоефітом *Streptomyces* sp. або його культурою, яка зберігається під шифром IDAC 081111-06 або яка містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6. У варіанті реалізації винаходу, спосіб підвищує схожість насіння, зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, зменшує гідротермальний час, необхідний для проростання, підвищує силу росту насіння, збільшує сиру вагу проростків, підвищує частоту утворення бульб і активність бактерій роду *Rhizobium* та/або підвищує врожайності проростків. В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає зменшення наслідків впливу стресу, такого як посуха, тепловий стрес та/або біотичний стрес, такий як інфікування патогенним грибом роду *Fusarium*.

В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає наступні етапи: інокуляція насіння ізольованим ендоефітом *Paraconyothirium* sp. або його культурою, яка зберігається під шифром IDAC 081111-03 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 5. У варіанті реалізації винаходу спосіб збільшує схожість насіння, зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, зменшує гідротермальний час, необхідний для проростання, підвищує силу росту насіння, збільшує сиру вагу проростків та/або збільшує кількість проростків. В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає зменшення наслідків стресу, такого як посуха, тепловий стрес та/або біотичний стрес, такий як інфікування патогенним грибом роду *Fusarium*.

У ще одному варіанті реалізації винаходу спосіб включає наступні етапи: інокуляція насіння ізольованим ендоефітом *Pseudeurotium* sp. або його культурою, яка зберігається в IDAC під шифром 081111-02 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 4. У варіанті реалізації винаходу, спосіб зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, зменшує гідротермальний час, необхідний для проростання, збільшує силу росту насіння та/або збільшує сиру вагу проростків. В іншому варіанті реалізації винаходу, спосіб включає зменшення наслідків стресу, такого як посуха т/або тепловий стрес.

У додатковому варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляція насіння ізольованим ендоефітом *Pseudeurotium* sp. або його культурою, яка зберігається в IDAC під шифром 081111-01 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 3. У варіанті реалізації винаходу спосіб підвищує схожість насіння, зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, знижує гідротермальний час, необхідний для проростання, підвищує силу росту насіння та/або підвищує кількість проростків. В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає посилену стратифікацію, переривання стану спокою і збільшення стресостійкості шляхом модуляції експресії генів гормонів ент-каурінової кислоти (КАО), репресора росту пагонів (RSG), абсцизової кислоти (АБК (ABA)), гіберелінової кислоти (ГК (GA)), генів 14-3-3 або оксиду азоту (NO) та/або генів стресостійкості супероксиддисмутази (СОД (SOD)), марганець-супероксиддисмутази (MnСОД), генів проліну (Pro) та MYB, зниження наслідків впливу стресу, такого як посуха, тепловий стрес та/або біотичного стресу, такого як інфікування патогенним грибом роду *Fusarium*.

У додатковому варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляція насіння ізольованим ендоефітом *Cladosporium* sp. або його культурою, яка зберігається в IDAC під шифром 200312-06 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 1. У варіанті реалізації винаходу спосіб зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, зменшує гідротермальний час, необхідний для проростання, збільшує силу росту насіння та/або збільшує сиру вагу проростків. У варіанті реалізації винаходу спосіб включає зменшення наслідків стресу, такого як посуха та/або тепловий стрес.

У ще одному варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляція насіння ізольованим ендоефітом *Cladosporium* sp. або його культурою, яка зберігається в IDAC під шифром 200312-05 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 2. У варіанті реалізації винаходу спосіб включає зменшення наслідків стресу, такого як посуха та/або теплової стрес.

У варіанті реалізації винаходу насіння вкрите ендоефітами, культивується з ендоефітами або висаджується поруч з ендоефітами. У конкретному варіанті реалізації насіння висаджують поряд з ендоефітами, на відстані близько 4 см від ендоефітів.

В якості рослини може бути використана будь-яка рослина. В одному з варіантів реалізації винаходу використана рослина являє собою злакові (пшениця або ячмінь), бобові (горох, сочевиця або нут), льон, ріпак, хвойне дерево (ялина або сосна), широколистяні дерева (верба або тополя), чагарник (карагана або терескен) або трав'яниста рослина (костриця або волоснець).

У іншому аспекті в даному документі пропонується спосіб покращення здоров'я рослин та/або врожайності рослин, що включає обробку рослинного посадкового матеріалу або самої рослини ендоефітом або його культурою, яка описана в даному документі, або їхньою комбінацією, сумішшю або композицією, яка описана в даному документі; та культивування рослинного посадкового матеріалу до рослини першого покоління або надання можливості рослині рости.

У варіанті реалізації винаходу рослинний посадковий матеріал являє собою будь-яку генеративну/статеву (насіння, генеративна брунька або квітка) або вегетативну/безстатеву (стебло, живець, корінь, цибулина, кореневище, бульба, вегетативна брунька або лист) частину рослини, з якої можна культивувати нову рослину.

У варіанті реалізації винаходу з ізольованим ендоефітом чи культурою такого ендоефіта був

ізолюваний штам ендоефіта *Streptomyces* sp. або його культура, яка зберігається в International Depositary Authority of Canada (IDAC, Національна мікробіологічна лабораторія. Агентство суспільної охорони здоров'я Канади. 1015 Арлінгтон стріт, Вінніпег, Манітоба, Канада, R3E 3R2), код доступу 081111-06, або який містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6; ізолюваний штам ендоефітів *Paraconiothirium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-03 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 5; ізолюваний ендоефіт *Pseudeurotium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-02 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 4; ізолюваний ендоефіт *Penicillium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-01 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 3; ізолюваний ендоефіт *Cladosporium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 200312-06 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 1; та/або ізолюваний ендоефіт *Cladosporium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 200312-05 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 2.

У варіанті реалізації винаходу способи стимулюють процеси розвитку ландшафту та ремедіації. Отже, в одному з варіантів реалізації винаходу запропонований спосіб зменшення забруднення ґрунту, який включає: обробку рослинного посадкового матеріалу або рослини ендоефітами, чи культурою, яка описана в даному документі, або їхньою комбінацією, або їхньою сумішшю або композицією, яка описана в даному документі; та культивування рослинного посадкового матеріалу до рослини першого покоління або надання можливості рослині рости. В одному варіанті реалізації винаходу забруднювачем ґрунту є вуглеводні, нафта чи інші хімічні речовини, солі або метали, такі як свинець, кадмій або радіоізотопи.

В іншому варіанті реалізації винаходу способи зменшують наслідки впливу стресових факторів, таких як посуха, підвищена температура та/або біотичні стресові фактори.

В якості рослини може бути використана будь-яка рослина. В одному з варіантів реалізації винаходу, рослина являє собою злакове (пшениця або ячмінь), бобове (горох, сочевиця або нут), льон, ріпак, хвойне дерево (ялина або сосна), широколистяне дерево (верба або тополя), чагарник (карагана або терескен) або трав'янисту рослину (костриця або волоснець).

Інші властивості та переваги даного винаходу стануть очевидними з наступного докладного опису. Проте слід враховувати, що детальний опис і конкретні приклади, які розкривають окремі кращі варіанти реалізації даного винаходу, наведені тільки в ілюстративних цілях, і різні зміни в суті й обсязі винаходу будуть очевидними для фахівців в даній галузі техніки з наведеного детального опису і відповідних графічних матеріалів та умовних позначень графічних матеріалів.

Короткий опис графічних матеріалів

Розкриття винаходу далі буде описано з посиланнями на графічні матеріали, де:

Фігура 1 ілюструє фенотипічні прояви ендоефітних грибів штамів SMCD 2204 2004F, 2206, 2208, 2210 та бактеріального штаму SMCD 2215; після 10 днів росту на КДА при 21°C.

Фігура 2 ілюструє передбачуване філогенетичне дерево *Cladosporium* spp. SMCD 2204 і SMCD 2204F, створене шляхом приєднання сусідів на підставі ITS рДНК. Числа на вузлових точках відображають значення статистичного бутстрепа, які отримані при 1000 повторень; проілюстровані тільки значення > 70 %. Планка відображає 0,01 нуклеотидних замін на сайт (розташування нуклеотиду).

Фігура 3 ілюструє передбачуване філогенетичне дерево *Penicillium* sp. SMCD 2206, створене шляхом приєднання сусідів на підставі ITS рДНК. Числа на вузлових точках відображають значення статистичного бутстрепа, які отримані при 1000 повторень; проілюстровані тільки значення > 70 %. Планка відображає 0,01 нуклеотидних замін на сайт (розташування нуклеотиду).

Фігура 4 ілюструє передбачуване філогенетичне дерево *Pseudeurotium* sp. SMCD 2208, створене шляхом приєднання сусідів на підставі ITS рДНК. Числа на вузлових точках відображають значення статистичного бутстрепа, які отримані при 1000 повторень; проілюстровані тільки значення > 70 %. Планка відображає 0,01 нуклеотидних замін на сайт (розташування нуклеотиду).

Фігура 5 ілюструє передбачуване філогенетичне дерево *Coniothyrium* штаму SMCD 2210, створене шляхом приєднання сусідів на підставі ITS рДНК. Числа на вузлових точках відображають значення статистичного бутстрепа, які отримані при 1000 повторень; проілюстровані тільки значення > 70 %. Планка відображає 0,05 нуклеотидних замін на сайт (розташування нуклеотиду).

Фігура 6 ілюструє передбачуване філогенетичне дерево штаму *Streptomyces* sp SMCD 2215,

створене шляхом приєднання сусідів на підставі 16S рДНК. Числа на вузлових точках відображають значення статистичного бутстрапа, отримані при 1000 повторень; проілюстровані тільки значення > 60 %. Планка відображає 0,05 нуклеотидних замін на сайт (розташування нуклеотиду).

5 Фігура 7 ілюструє праву частину розділеної чашки (рослина з мікробним партнером): прояв фенотипічних ознак здорової пшениці, коріння якої під час росту контактували з бактеріальним матом; і ліву частину розділеної чашки (рослина без мікробного партнера): масове формування кореневих волосків пшениці, яке обумовлене взаємозв'язками між грибом і рослиною, сформованими в лівій частині розділеної чашки.

10 Фігура 8 (A) і (C) ілюструє переривчасту колонізацію тканин коренів пшениці (епідермісу та кори) SMCD 2206, у порівнянні з (B) і (D), які ілюструють патогенну рівномірну/безперервну клітинну колонізацію коренів пшениці грибом *Fusarium graminearum*, в тому числі в зоні судинного циліндра.

15 Фігура 9 ілюструє індекс Ireg – рівень відхилення (нерівномірності) форми клітин ендоефітів (SMCD).

Фігура 10 ілюструє індекс Idir – рівень змін напрямку при колонізації живої клітини рослини-хазяїна.

20 Фігура 11 ілюструє ендоефітні гіфи в корені проростка пшениці (A-SMCD 2204; B-SMCD 2206; C-SMCD 2210 і D-SMCD-2215), візуалізування за допомогою фарбування лактофуксином та флюоресцентної мікроскопії. Симбіотичні структури/органи: D) бактеріальний ендоефіт SMCD 2215 формує, в основному, вигнуті міжклітинні філаменти, тоді як ендоефітний грибок (Фігури праворуч) формує: SMCD 2204 – внутрішньоклітинні завиті структури та арбускули, SMCD 2206 – внутрішньоклітинні везикули і SMCD 2210 – внутрішньоклітинні вузлики.

25 Фігура 12 ілюструє зовнішній вигляд проростаючих симбіотичних проростків пшениці через 10 днів на вологому фільтрувальному папері при 21°C.

Фігура 13 ілюструє довжину листя проростаючих проростків симбіотичної пшениці через 10 днів на вологому фільтрувальному папері при 21°C.

30 Фігура 14 відображає спосіб інокуляції *in vitro* (A). Агарова пластинка, площею 5 мм², вирізана з краю материнської колонії, була розміщена вкритої гіфами стороною донизу в центр 60 мм чашки Петрі з картопляно-декстрозним агаром (КДА). Далі, п'ять насінин зі стерилізованої поверхнею розміщували поблизу від агарної пластинки, на відстані, відповідному 48 годинам росту гіф, і пророщували в темряві. Вплив трьох різних способів поверхневої стерилізації насіння на їхню схожість (B). Стовпці, які відмічені однією або двома зірочками (*), мають значущі або дуже значущі відмінності від такого ж ендоефіта, вирощеного в умовах контролю ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим *post-hoc* LSD аналізом). Планки похибок відображають стандартну помилку середнього (SE).

40 Фігура 15 ілюструє темпи росту вільноживучих ендоефітів SMCD 2204, 2206, 2208, 2210 і 2215 *in vitro* на картопляно-декстрозному агарі (КДА) в умовах теплового стресу (36 °C), посухи (8 % поліетиленгліколю (ПЕГ) 8000), в контрольних умовах протягом п'яти днів та при одночасній дії високої температури (36 °C) і посухи (8 % ПЕГ) протягом шести днів. Стовпці, які відмічені однією або двома зірочками (*), мають значущі або дуже значущі відмінності від такого ж ендоефіта, вирощеного в контрольних умовах ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим *post-hoc* LSD аналізом). Планки похибок відображають стандартну помилку середнього (SE).

45 Фігура 16 ілюструє відсоток схожості та сиру вагу проростків при ініціальних експериментах, в яких поверхню насіння стерилізували 5 % розчином натрій гіпохлориту протягом 3 хв. Відсоток схожості насіння пшениці *in vitro* вимірювали після трьох днів вирощування на картопляно-декстрозному агарі (КДА) під впливом теплового стресу (36°C), посухи (8 % поліетиленгліколю (ПЕГ) 8000) і в контрольних умовах (A, B і C). Вісь у нормували відносно показника відсотка схожості насіння, вирощеного в аналогічних умовах, але поверхню якого стерилізували 5 % натрій гіпохлоритом протягом 1 хв. Сиру вагу проростків *in vitro* вимірювали на 7-й день вирощування на КДА під впливом теплового стресу, посухи та в контрольних умовах (D, E і F). Стовпці, які відмічені однією (*) або двома зірочками (**), мають значущі або дуже значущі відмінності від контролю, що не містять ендоефітів ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим *post-hoc* LSD аналізом). Планки похибок відображають стандартну помилку середнього (SE).

60 Фігура 17 ілюструє відсоток схожості насіння пшениці, яке культивували протягом деякого часу разом з ендоефітами, що сприяють найбільш ефективному формуванню стійкості до абіотичних стресів (SMCD 2206, 2210 і 2215), у порівнянні з не колонізованим і тим, що не перебувало в стресових умовах, насінням (позитивний контроль) і з не колонізованим, але тим,

що перебувало в стресових умовах, насінням (негативний контроль). Енергія проростання (EG) залежить від терміну часу, в днях (вісь x), при якому досягається 50 % схожість (вісь y). Символи "■", "x", "○", "Δ", і "□" відображають позитивний контроль, насіння оброблене SMCD 2206, насіння оброблене SMCD 2210, насіння оброблене SMCD 2215 і негативний контроль, відповідно. Показники для теплового стресу і посухи відповідали 36 °C і 8 % поліетиленгліколю (ПЕГ) 8000, відповідно. Планки похибок відображають стандартну помилку середнього (SE). Примітка: насіння, що використовували при визначенні EG, було отримано на другій стадії експериментів, і, отже, стерилізували 5 % розчином натрій гіпохлориту протягом однієї, а не трьох хвилин.

Фігура 18 ілюструє відношення між гідротермальним часом (HTT), необхідним для досягнення 50 % схожості під впливом спеки та посухи окремо і 5 % схожості під впливом комбінації спеки та посухи (вісь x), і відсотком схожості, досягнутим через сім днів (вісь y). Значення схожості через 7 днів і HTT, які отримані, виходячи з результатів другої стадії експериментів. Символи "■", "◆" та "▲" зображують насіння, яке піддавалося тепловому шоку (36 °C), посухи (8 % поліетиленгліколю (ПЕГ) 8000) або обом, тепловому шоку і посузі, відповідно. Значення R-квадрата, асоційованого з лініями тренда, дорівнюють 0,96, 0,80 і 0,18 для насіння, яке зазнало високої температури, посухи чи високої температури та посухи, відповідно. Примітка: насіння, яке використовували при визначенні відсотка схожості на цьому добу і гідротермального часу (HTT), було отримано на другій стадії експериментів, і, отже, обробляли 5 % розчином натрій гіпохлориту протягом однієї, а не трьох хвилин.

Фігура 19 ілюструє, що у насіння, обробленого або інокуюваного штамми SMCD, спостерігали покращення всіх протестованих параметрів проростання насіння, у тому числі ефективності сили проростання насіння (SGV).

Фігура 20 ілюструє співвідношення значень ефективності посухостійкості (DTE) сортів пшениці (A) і ячменю (B), необроблених (E-) і оброблених (E+) ендоефітів, на підставі значень усередненого симбіотичного ефекту при використанні всіх протестованих виділених SMCD, при зборі врожаю моделювали тепловий стрес в умовах оранжереї.

Фігура 21 ілюструє (A) підвищення врожайності пшениці модифікаторами-ендоефітами (E+) (SMCD 2206, SMCD 2210 і 2215), у порівнянні з контролем (E-) (врожайність г/3 горщики). (B) підвищення врожайності інокулянтами-ендоефітами (SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2215) у дворядного ячменю (B_a) і шестирядного ячменю (B_b) (врожайність: 3 рослини/горщик).

Фігура 22 ілюструє (A) шестирядний ячмінь сорту AC Metcalfe, зліва направо: Посуха (E-), Посуха і SMCD 2206 (E+), Контроль (E-), Контроль і SMCD 2206 (E+); (B) сорт Wheat-Unity, зліва направо: Посуха (E-), Посуха і SMCD 2215 (E+), Контроль (E-), Контроль і SMCD 2215 (E+); (C) сорт Wheat-Verona, зліва направо: Посуха (E-), Посуха і SMCD 2215 (E+), Контроль (E-), Контроль і SMCD 2215 (E+); (D) тверда пшениця TEAL, зліва направо: Посуха (E-), Посуха і SMCD 2210 (E+), Контроль (E-), Контроль і SMCD 2210 (E+).

Фігура 23 ілюструє суху вагу стеблин (A) нуту, (B) сочевиці і (C) гороху, вирощених в симбіозі з SMCD ендоефітами (E+) під впливом теплового стресу в умовах фітотрону. Колонки, відмічені однією (*) або двома зірочками (**), мають значущі або дуже значущі відмінності, порівняно з тим контролем без ендоефіта, який культивували в умовах стресу ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим post-hoc LSD аналізом).

Фігура 24 ілюструє суху вагу стручків (A) нуту, (B) сочевиці і (C) гороху, вирощених в симбіозі з SMCD ендоефітами (E+) під впливом теплового стресу в умовах фітотрону. Колонки, які відмічені однією (*) або двома зірочками (**), мають значущі або дуже значущі відмінності, порівняно з тим контролем без ендоефіта, який культивували в умовах стресу ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим post-hoc LSD аналізом).

Фігура 25 ілюструє суху вагу коренів (A) нуту, (B) сочевиці і (C) гороху, вирощених в симбіозі з SMCD ендоефітів (E+) під впливом теплового стресу в умовах фітотрону. Колонки, які відмічені однією (*) або двома зірочками (**), мають значущі або дуже значущі відмінності, порівняно з тим контролем без ендоефіта, який культивували в умовах стресу ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим post-hoc LSD аналізом).

Фігура 26 ілюструє суху вагу стеблин (A) нуту, (B) сочевиці і (C) гороху, вирощених в оранжереї в умовах посухи. Колонки, які відмічені однією (*) або двома зірочками (**), мають значущі або дуже значущі відмінності, порівняно з тим контролем без ендоефіта (E-), який культивували в умовах стресу ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим post-hoc LSD аналізом).

Фігура 27 ілюструє суху вагу стручків (A) нуту, (B) сочевиці і (C) гороху, при взаємодії з ендоефітами (E+) в оранжереї в умовах посухи. Колонки, які відмічені однією (*) або двома зірочками (**), мають значущі або дуже значущі відмінності порівняно з тим контролем без

ендофіта (E-), який культивували в умовах стресу ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим post-hoc LSD аналізом).

5 Фігура 28 ілюструє суху вагу коренів (A) нуту, (B) сочевиці і (C) гороху, вирощених в оранжереї в умовах посухи. Колонки, які відмічені однією (*) або двома зірочками (**), мають значущі або дуже значущі відмінності порівняно з тим контролем без ендоефіта (E-), який культивували в умовах стресу ($p \leq 0,05$ або $p \leq 0,01$, відповідно; ANOVA, з подальшим post-hoc LSD аналізом).

10 Фігура 29 ілюструє: A. квітучі рослини нуту Vanguard, плодоносні стручки в умовах впливу посухи в оранжереї – ліва рослина не симбіотична (E-), права рослина в симбіотичних відносинах з представниками штаму SMCD 2215 (E+); B і C, рослини нуту Vanguard, плодоносні стручки в умовах впливу посухи в теплиці – (B) в не симбіотичних і (C) в симбіотичних відносинах з представниками штаму SMCD 2215.

15 Фігура 30 ілюструє утворення бульбочок на коренях різних сортів гороху під впливом теплового стресу в умовах фітотрону: Hendel (зверху) і Golden (знизу), інокульований (ліворуч) і неінокульований (праворуч) з SMCD 2215. Примітка: у всіх зразках був виявлений природний інфекційний агент *Rhizobium* sp. з насіння гороху.

Фігура 31 у вигляді функції від часу ілюструє значне збільшення енергії проростання (≥ 50 %) насіння Glamis (сочевиці) ендоефітами SMCD2206 і SMCD 2215 в умовах теплового стресу і посухи in vitro.

20 Фігура 32 у вигляді функції від часу ілюструє значне збільшення енергії проростання (≥ 50 %) насіння Handel (горох) ендоефітами SMCD2206 і SMCD 2215 в умовах теплового стресу та посухи in vitro.

25 Фігура 33 ілюструє підвищення ендоефітними модифікаторами (SMCD 2206 і SMCD 2210) врожайності льону в умовах посухи в теплиці. Різні літери над колонками відображають наявність статистично достовірних відмінностей між зразками ($p < 0,05$, критерій Краскела-Уолліса).

30 Фігура 34 ілюструє підвищення врожайності ріпаку ендоефітними інокулянтами (SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2215) в умовах посухи в оранжереї. Різні літери над колонками відображають наявність статистично достовірних відмінностей між зразками ($p < 0,05$, критерій Краскела – Уолліса).

35 Фігура 35 ілюструє здатність виживання насіння пшениці, преінокульованого in vitro (чашки Петрі у верхньому ряду) та проростків пшениці, преінокульованих в умовах оранжереї (чашки Петрі в нижньому ряду) ендоефітом SMCD 2206, показуючи рослини, які вирости здоровими, і з патогенними *Fusarium avenaceum* і *Fusarium graminearum* – з відображенням симптомів хвороби та смерті рослин.

Фігура 36 ілюструє вирощені в зернах пшениці інокулянти *Fusarium*.

Фігура 37 ілюструє те, що випрівання в післясходовий період в умовах оранжереї було попереджено ендоефітом SMCD 2206.

40 Фігура 38 ілюструє збільшення біомаси (надземна a-d і коріння e-f) пшениці при наявності ендоефітів SMCD 2206, у порівнянні з необробленою рослиною. (a) контрольна рослина (E-), (b) інокульована рослина (E+), (c) контрольна квітуча рослина, (d) інокульована квітуча рослина, (e) контрольна рослина (E-, ліворуч) у порівнянні з інокульованою SMCD 2206 рослиною (E+, праворуч), і (f) флуоресцентна мікроскопія коренів пшениці, колонізованих SMCD 2206 (E+).

45 Фігура 39 ілюструє біомасу наземних частин рослини/на одну рослину (ліворуч) і біомасу підземних (коріння) частин рослини/на одну рослину (праворуч) у контрольних (E-) і рослин, інокульованих SMCD (E+) проти *F. graminearum* і *F. avenaceum*. Вертикальні похибки на точках значень відображають стандартну помилку середнього.

50 Фігура 40 ілюструє довжину коренів контрольних рослин (CDC Teal) без ендоефітів SMCD порівняно з рослинами, які були інокульовані штамами SMCD. Планки на точках значень відображають стандартну помилку середнього.

Фігура 41 ілюструє суху масу рослини/на одну рослину (сорт TEAL) при використанні методу подвійної попередньої інокуляції: a) ендоефіт SMCD+*Fusarium avenaceum* (F.av), і b) ендоефіт SMCD+*Fusarium graminearum* (F.gr). Вертикальні планки похибок на точках значень відображають стандартну помилку середнього.

55 Фігура 42 ілюструє порівняння розмірів колосків пшениці TEAL, у присутності патогена (негативний контроль) і при відсутності патогена (негативний контроль). Фігура зліва – зліва направо: i) рослина + F.gr, ii) рослина + F.av, та iii) рослина; фігура праворуч – зліва направо: i) рослина; ii) рослина + ендоефіт; iii) рослина + ендоефіт + F. av; і iv) рослина + ендоефіт + F.gr.

60 Фігура 43 ілюструє штам-специфічний патерн проростання симбіотичного насіння, описаний як міковітальність: Handel+6 % ПЕГ – Контроль (A), Handel+6 % ПЕГ + SMCD 2204 (B);

Handel+6 % ПЕГ + SMCD 2204F (C), Handel+6 % ПЕГ + SMCD 2206 (D), Handel+6 % ПЕГ + SMCD 2210 (E), Handel+6 % ПЕГ + SMCD 2215 (F) через 7 днів при 21°C в темряві.

Фігура 44 ілюструє експресію пов'язаних з (A) СОД і (B) MnСОД генів у Handel, які піддавали впливу ПЕГ, у присутності ендоефітів та без них.

5 Фігура 45 ілюструє експресію генів, пов'язаних з проліном у Handel, які піддавали впливу ПЕГ, з ендоефітами та без них.

Фігура 46 ілюструє *in vitro* проростання насіння пшениці після трьох днів перебування на картопляно-декстрозному агарі (КДА). Холодова стратифікація була вдосконалена шляхом утримування насіння в холодильній камері при 4°C протягом 48 годин. При непрямій та прямій обробці ендоефітами, насіння пророщували на близько 4 см відстані або при безпосередньому контакті з ендоефітами, відповідно. А) Відсоток схожості в порівнянні з енергією проростання (50 % проростання). В) Ефективність проростання насіння пшениці, яке зазнало холодової та біологічної стратифікації. Ефективність проростання розраховувалася шляхом віднімання з відсотка схожості обробленого насіння відсотка схожості контрольованого насіння.

15 Фігура 47 ілюструє специфічні патерни експресії генів гібереліну (TaGA3ox2 і 14-3-3) і АБК (TaNCED2 і TaABA8'OH1) в колеоризі проростаючого насіння пшениці протягом трьох днів холодової та біологічної стратифікації. Рівень експресії генів розраховували як $2^{-\Delta CT}$.

Фігура 48 ілюструє співвідношення рівнів експресії генів ($2^{-\Delta CT}$) гібереліну (TaGA3ox2 і 14-3-3) і АБК (TaNCED2 і TaABA8'OH1) в колеоризі проростаючого насіння пшениці протягом трьох днів холодової та біологічної стратифікації.

20 Фігура 49 ілюструє відносні патерни експресії регуляторних генів гормонів RSG і KAO і генів стійкості MYB 1 and MYB 2 в колеоризі проростаючого насіння пшениці протягом трьох днів холодової та біологічної стратифікації. Рівень експресії генів розраховувався як $2^{-\Delta CT}$.

Фігура 50 ілюструє вихід первинного кореня у проростаючому зерні пшениці (A) інвертоване флуоресцентне (B) та флуоресцентне зображення флуоресценції DAF-2DA при взаємодії з NO в клітинах первинного кореня (C) проростка AC Avonlea через 5 хв. після обробки [Nakatsubo et al. 1998] ексудатом грибка SMCD 2206. Флуоресцентна реакція в контрольних клітинах зародкового первинного кореня виявлена не була. Масштаб = 25 мкм; Масштаб = 50 мкм.

Фігура 51 ілюструє значення інтенсивності флуоресценції DAF-2T через 5 хв. після обробки первинних коренів з проростків пшениці AC Avonlea ексудатом з грибків SMCD 2206 ексудатом з грибків разом з поглиначем NOcPTIO, та стерильною водою. Сегменти первинного кореня інкубували протягом 30 хв в 2 мл детекційного буферу (10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 10 мМ KCl), що містить 15 мМ DAF-2DA (Sigma-Aldrich) або без 1 мМ 2-(4-карбоксифеніл)-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксид-3-оксиду (cPTIO) як поглинача NO. Середні значення флуоресценції представлені як відношення інтенсивності флуоресценції на 5 хв до інтенсивності флуоресценції в момент часу 0. Різні літери відображають наявність статистично достовірних відмінностей між зразками ($p < 0,05$, критерій Краскела – Уолліса).

Детальний опис винаходу

Нові штами, композиції та насіння

40 Автори винаходу виділили 6 нових штамів ендоефітів, які покращують життєздатність насіння та здоров'я рослин, та врожайності при нормальних та/або стресових умовах. Ці ендоефіти зберігаються в таких організаціях: International Depository Authority of Canada – IDAC (зберігання вихідних штамів – IDAC, Національна мікробіологічна лабораторія, Агентство суспільної охорони здоров'я Канади, 1015 Арлінгтон Стріт, Вінніпег, Манітоба, Канада, R3E 3R2; квитанції прийому та підтвердження життєздатності в Додатку A) Saskatchewan Microbial Collection and Database – SMCD (зберігаються копії штамів) Штами:

(a) IDAC 081111-06=SMCD 2215;

(b) IDAC 081111-03=SMCD 2210;

(c) IDAC 081111-02=SMCD 2208;

50 (d) IDAC 081111-01=SMCD 2206;

(e) IDAC 200312-06=SMCD 2204; та

(f) IDAC 200312-05=SMCD 2204F.

Відповідно, даний винахід пропонує ізолюваний штам ендоефіта *Streptomyces* sp., або його культуру, яка зберігається під шифром IDAC 081111-06 або яка містить послідовність 16S рДНК, що представлена на SEQ ID NO: 6; ізолюваний штам ендоефіта *Paraconyothirium* sp., або його культуру, яка зберігається під шифром IDAC 081111-03 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена на SEQ ID NO: 5; ізолюваний штам ендоефіта *Pseudeurotium* sp., або його культуру, яка зберігається під шифром IDAC 081111-02 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена на SEQ ID NO: 4; ізолюваний штам ендоефіта *Penicillium* sp., або його культуру, яка зберігається під шифром IDAC 081111-01 або яка містить послідовність ITS рДНК,

що представлена на SEQ ID NO: 3; ізолювану культуру *Cladosporium* sp., яка зберігається під шифром IDAC 200312-06 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена на SEQ ID NO: 1; та/або ізолюваний ендofіт *Cladosporium* sp. або його культуру, яка зберігається під шифром IDAC 200312-05 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена на SEQ ID NO: 2; або їхні комбінації, або суміші.

Термін "ендофіт", який використовується в даному документі, відноситься до грибів або бактеріальних організмів, які можуть жити в симбіозі з рослиною всередині неї, і також згадується в даному документі як "ендосимбіонт". Грибний ендofіт може перебувати у формі спор, гіф або міцели. Бактеріальний ендofіт може перебувати у формі клітини або групи клітин. Термін "ендофіт", який використовується в даному документі, включає дочірні штами, які представлені в даному документі.

Також у даному документі пропонується композиція, що містить ізолюваний ендofіт або культуру, яка представлена в даному документі, або їхню комбінацію, або їхню суміш з носієм. Типові носії включають інертний матеріал (на не вуглецевій основі), використовуваний для підтримки та доставки щільно розміщеного активного інгредієнта до мети, і, необов'язково, допоміжні сполуки, обмежуються цим; сприяють та підтримують виконання функцій активним інгредієнтом, захищаючи його від УФ-випромінювання; забезпечують стійкість до дощу; утримують вологу або захищають від висихання; та/або сприяють поширенню та розосередженню біопестицидів при використанні стандартного сільськогосподарського обладнання, так як це було описано Hynes і Boyetchko (2006, *Soil Biology&Biochemistry* 38: 845-84).

В іншому варіанті реалізації винаходу композиція містить щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5 або 6 штамів або культур, наведених у даному документі.

Також у даному документі пропонується композиція, що містить ізолюваний ендofіт або його культуру, яка представлена в документі, або їхню комбінацію, або їхню суміш з носієм.

В одному з варіантів реалізації винаходу насіння інокулювали шляхом інокуляції у ґрунт. В іншому варіанті реалізації винаходу насіння покрито ендofітом або його культурою. У ще одному варіанті реалізації винаходу ендofіт або його культуру, вводили в насіння шляхом розпилення, ін'єкції, інокуляції, прищеплення, покриття ними насіння або обробкою ними насіння.

Способи

Нижче пропонується спосіб підвищення життєздатності насіння, поліпшення здоров'я рослин та/або їхньої врожайності, що включає інокуляцію насіння ендofітом або його культурою, описаними в даному документі, або їхньою комбінацією, або їхньою сумішшю з композицією, описаною в даному документі; і культивування з насіння рослини першого покоління.

Фраза "інокуляція насіння", яка використовується в даному документі, стосується нанесення, зараження, спільної посадки або покриття насіння ендofітами. Методи інокуляції насіння добре відомі в даній області техніки, наприклад, як описано [Hynes і Boyetchko 2006, *Soil Biology&Biochemistry* 38: 845-84].

Термін "посилення життєстійкості насіння", який використовується в даному документі, відноситься до пренатального догляду за рослиною, що приводить до поліпшення схожості насіння, і його здатності до формування рослини в нормальних та/або стресових умовах, і включає будь-який один або більше з наведених нижче ефектів, але не обмежується ними: виведення зі стану спокою, забезпечення стратифікації насіння, збільшення схожості, зміна експресії генів, зменшення часу, необхідного для досягнення енергії проростання, захист від біотичних стресів, захист від абіотичних стресів, зменшення гідротермального часу, необхідного для проростання, збільшення сили проростання насіння, збільшення ефективності проростання насіння, збільшення рівномірності проростання насіння, збільшення ефективності стійкості до високих температур/посухи, збільшення ваги проростків та врожайності проростків. Ефективність стійкості до посухи/високих температур (DTE/THE) являє собою термін протилежний за значенням (антонімом) до чутливості.

Енергія проростання визначається як 50 % схожість, по відношенню до загального числа насіння, яке тестували. Сила росту насіння відображає різницю між відсотком схожості обробленого насіння і відсотком схожості необробленого насіння. Поняття гіпотермального часу постулює, що кожне окреме зерно починає проростати тоді, коли сума температури та водного потенціалу досягла, протягом деякого часу, рівня, достатнього для початку проростання. Ефективність проростання визначається як процентне співвідношення обробленого насіння, що проростає по закінченню певного періоду часу після посадки, до числа насіння, яке тестували в якості необробленого контролю. Біологічна стратифікація визначається як виведення насіння зі стану спокою симбіонтом шляхом стимуляції його проростання. Однорідність проростання

насіння являє собою максимальний відсоток схожості насіння, досягнутий протягом мінімального часу інкубації.

Термін "покращення здоров'я та/або врожайності рослин", використаний у даному документі, відноситься до загального покращення сільськогосподарських характеристик (наприклад, здоров'я і продуктивності) набутих рослиною, і включає будь-який один або більше з наведених нижче ефектів, але не обмежуються ними: зміна експресії генів RSG, KAO, ABA, GA, 14-3-3 або NO для поліпшення гормональної активності рослини, зміна експресії генів MYB, Pro, COD або MnCOD для підвищення стресостійкості, наприклад, стійкості до абіотичних і біотичних стресів, збільшення ваги різних органів, таких як корінь, стебло, листя та стручки, підвищення активності бактерій роду *Rhizobium*, і частоти утворення бульбочок, і покращення характеристик насіння першого або наступних поколінь, в тому числі, однієї або більше з наведених нижче характеристик, але не обмежуючись ними: ваги насіння в наступному поколінні та енергії проростання в наступному поколінні.

Гени гормонів KAO, RSG, ABAs, GAs, 14-3-3 та набори праймерів до них відповідають описаним Zhang et al. [2007]. Гени стресостійкості COD, MnCOD, Pro і MYB та набори праймерів до них наведені в Таблиці 6 та Таблиці 9 (SEQ ID NO: 8-19).

Термін "зниження" або "підвищення", який використовується в даному документі, відноситься до зниження або підвищення характеристик насіння, яке оброблене ендofітами або з якого проросла рослина, в порівнянні з необробленим насінням або рослиною, яка проросла з нього. Наприклад, зниження в характеристиках можуть мати значення щонайменше 5 %, 10 %, 15 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % або 200 % або нижче, ніж в необробленому контролі, та підвищення можуть мати значення щонайменше 5 %, 10 %, 15 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % або 200 % або більше, ніж в необробленому контролі.

В одному з варіантів реалізації винаходу рослину культивують в умовах абіотичного або біотичного стресу.

Термін "абіотичний стрес", який використовується в даному документі, відноситься до стресу під впливом неживої природи, який, як правило, впливає на життєздатність насіння та здоров'я рослини та включає тепловий стрес і посуху, але не обмежується ними. В одному з варіантів реалізації винаходу абіотичний стрес був тепловим стресом. В іншому варіанті реалізації винаходу абіотичний стрес був посухою, осмотичним стресом або засоленням. Термін "біотичний стрес", який використовується в даному документі, відноситься до стресу під впливом живої природи, який, як правило, впливає на життєздатність насіння та здоров'я рослини, і включає мікробні інфекції рослин, але не обмежується ними. В одному з варіантів реалізації винаходу біотичних стресом є інфікування патогенним грибом роду *Fusarium*.

В одному з варіантів реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляцію насіння виділеним ендofітом *Streptomyces* sp. чи культурою його штаму, яка зберігається під шифром IDAC 081111-06 або яка містить 16S рДНК, з послідовністю, що представлена в SEQ ID NO: 6. У варіанті реалізації винаходу спосіб збільшує схожість насіння, зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, знижує гідротермальний час, необхідний для проростання, підвищує силу проростання насіння, збільшує сиру вагу проростків, підвищує активність бактерій роду *Rhizobium* і частоту утворення бульбочок та/або підвищує врожайність проростків. В одному з варіантів реалізації винаходу спосіб включає: зменшення наслідків впливу стресових факторів, таких як посуха, високі температури та/або біотичний стрес.

В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляцію насіння ізолюваним ендofітом *Paraconyothirium* sp. або його культурою, яка зберігається під шифром IDAC 081111-03 або ж яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 5. У варіанті реалізації винаходу спосіб збільшує схожість насіння, зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, зменшує гідротермальний час, необхідний для проростання, підвищує силу проростання насіння, збільшує сиру вагу проростків та/або збільшує врожайність проростків. В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає: зменшення наслідків дії стресових факторів, таких як посуха, підвищена температура та/або біотичний стрес.

У ще одному варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляцію насіння ізолюваним ендofітом *Pseudeurotium* sp. або його культурою, яка зберігається в IDAC під шифром 081111-02 або ж яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 4. У варіанті реалізації винаходу спосіб зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, знижує гідротермальний час, необхідний для проростання, збільшує силу росту насіння та/або збільшує сиру вагу проростків. В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає зменшення наслідків стресу, такого як посуха та/або тепловий стрес.

У додатковому варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляцію насіння ізолюваним ендofітом *Penicillium* sp. або його культурою, яка зберігається під шифром IDAC

081111-01 або ж яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 3. У варіанті реалізації винаходу спосіб підвищує схожість насіння, зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, знижує гідротермальний час, необхідний для проростання, підвищує силу росту насіння та/ або підвищує врожайність проростків. В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає: зменшення наслідків дії стресових факторів, таких як посуха, підвищена температура та/ або біотичний стрес. В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає: посилення стратифікації, виведення насіння зі стану спокою та збільшення стресостійкості шляхом зміни експресії генів гормонів KAO, RSG, ABAs, GAs, 14-3-3 або NO та/ або експресії генів стресостійкості COD, MnCOD, Pro або MYB, зменшення наслідків дії стресових факторів, таких як посуха, підвищена температура та/ або біотичний стрес.

У ще одному варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляцію насіння ізольованим ендоефітом *Cladosporium* sp. або його культурою, яка зберігається під шифром IDAC 200312-06, або ж яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 1. У варіанті реалізації винаходу спосіб зменшує час, необхідний для досягнення енергії проростання, зменшує гідротермальний час, необхідний для проростання, збільшує силу проростання насіння та/ або збільшує сиру вагу проростків. У варіанті реалізації винаходу спосіб включає зменшення наслідків стресу, такого як посуха та/ або тепловий стрес.

У ще одному варіанті реалізації винаходу спосіб включає такі етапи: інокуляцію насіння ізольованим ендоефітом *Cladosporium* sp. або його культурою, яка зберігається під шифром IDAC 200312-05, або ж яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 2. У варіанті реалізації винаходу спосіб включає зменшення наслідків стресу, такого як посуха, та/ або тепловий стрес.

Термін "рослина", який використовується в даному документі, ставиться до представників царства Plantae та включає рослини на всіх етапах життєвого циклу, включаючи насіння, але не обмежуючись ним. В одному з варіантів реалізації винаходу використана рослина була злаком (пшениця або ячмінь), бобовим (горох, сочевиця або нут), льоном або рапсом.

У варіанті реалізації винаходу насіння покриті ендоефітами, культивується з ендоефітами, або висаджується поруч з ендоефітами. У конкретному варіанті реалізації насіння висаджують поряд з ендоефітами, на відстані близько 4 см від ендоефіта.

В іншому аспекті винаходу в даному документі пропонується спосіб покращення здоров'я рослин та/ або врожайності рослин, що включає обробку рослинного посадкового матеріалу або самої рослини ендоефітом або його культурою, описаної в даному документі, або їхньою комбінацією, сумішшю або композицією, яка описана в даному документі; і культивування рослинного посадкового матеріалу до рослини першого покоління або надання можливості рослині вирости.

Термін "посадковий матеріал", який використовується в даному документі, відноситься до будь-якої генеративної/статевої чи вегетативної/безстатевої частини рослини, з якої можна отримати нову рослину. У варіанті реалізації винаходу рослинним посадковим матеріалом є генеративні – насіння, генеративна брунька або квітка і вегетативні – стебло, живець, корінь, цибулина, кореневище, бульба, вегетативна брунька або частини листя.

У варіанті реалізації в якості ізольованого ендоефіта або його культури використовували ізольований штам ендоефіта *Streptomyces* sp. або його культуру, яка зберігається в International Depositary Authority of Canada (IDAC, Національна мікробіологічна лабораторія. Агентство суспільної охорони здоров'я Канади. 1015 Арлінгтон Стріт, Вінніпег, Манітоба, Канада, R3E 3R2), код доступу 081111-06, або яка містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6; ізольований штам ендоефіта *Paraconyothirium* sp., або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-03 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 5; ізольований штам ендоефіта *Pseudeurotium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-02 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 4; ізольований ендоефіт *Penicillium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 081111-01 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 3; ізольована культура *Cladosporium* sp. яка зберігається під шифром доступу IDAC 200312-06 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 1, та/ або ізольований ендоефіт *Cladosporium* sp. або його культура, яка зберігається під шифром доступу IDAC 200312-05 або яка містить послідовність ITS рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 2.

В іншому варіанті реалізації винаходу способи зменшують наслідки впливу стресових факторів, таких як посуха, підвищена температура, та/ або біотичних стресових факторів.

У варіанті реалізації винаходу способи стимулюють процеси розвитку ландшафту і ремедіації.

Відповідно, в одному з варіантів реалізації винаходу описується спосіб фіторемедіації або фіторекламації забруднених ділянок, що включає обробку рослинного посадкового матеріалу, або рослини ендосфітами, або культурами, описаними в даному документі, або поєднанням їхньої суміші, або композицією, описаною в даному документі, та культивування рослинного посадкового матеріалу до рослин першого покоління або надання можливості рослині вирости; відновлюючи або ліквідуючи таким чином забруднену ділянку.

Термін "фіторемедіація", який використовується в даному документі, відноситься до застосування рослин для видалення, зменшення або нейтралізації речовин, відходів або небезпечних матеріалів з ділянки для того, щоб запобігти або мінімізувати будь-який несприятливий вплив на навколишнє середовище. Термін "фіторекламація", який використовується в даному документі, відноситься до застосування рослин для відновлення землі з порушеним покривом до первісного стану, або ж для продуктивного використання в інших цілях.

В одному з варіантів реалізації винаходу ділянкою є ґрунт, такий як ґрунт на полігоні зберігання відходів. В одному з варіантів реалізації винаходу до числа речовин, відходів або небезпечних матеріалів відносились вуглеводні, нафта чи інші хімічні речовини, солі або метали, такі як свинець, кадмій або радіоізотопи.

Фраза "обробка рослинного посадкового матеріалу або рослин", яка використовується в даному документі, відноситься до застосування ендосфітів, або їхніх культур, окремо або з будь-яким твердим або рідким засобом доставки в рослинний посадковий матеріал, або в рослину, або в частині зазначеної рослини. У варіанті реалізації винаходу обробка включає позакореневе введення ендосфіта або внесення його в ґрунт, або його комбінація з будь-яким твердим або рідким засобом доставки на будь-яких стадіях вирощування рослини.

В якості рослини може бути використана будь-яка рослина. В одному з варіантів реалізації винаходу використана рослина являла собою злаки (пшениця або ячмінь), бобові (горох, сочевиця або нут), льон, ріпак, хвойне дерево (ялина або сосна), широколистяні дерева (верба, тополя), чагарники (карагана або терескен) або трав'яниста рослина (костриця або волоснець).

Наведений вище опис в загальних рисах описує дану заявку. Більш повне розуміння може бути досягнуто при розгляді наступних конкретних прикладів. Дані приклади наведені виключно в цілях ілюстрації і не обмежують обсяг даного винаходу. Зміна форми і заміна еквівалентів розглядаються в якості умов, які можуть бути запропоновані або стають доцільними. Хоча в даному документі і були використані конкретні терміни, дані терміни призначені для описових цілей, а не для цілей обмеження.

Наведені нижче приклади не є обмежувачими і призначені для ілюстрації винаходу.

Приклади

Приклади (1-14)

Стан спокою та проростання знаходяться в залежності від декількох факторів і процесів. Для забезпечення успішного формування проростків, важливо контролювати основні процеси або умови. Роль генетичних властивостей рослин, гормонів і різних тканин насіння були вивчені досить ґрунтовно. Справжні приклади являють собою приклади досліджень взаємовідносин ендосфіт-насіння, перехідними до кореневої симбіотичної стадії при дозріванні рослини.

Приклад 1

Таксономія

International Depository Authority of Canada – IDAC (зберігає вихідні штами) і Saskatchewan Microbial Collection and Database – SMCD (зберігає копії штамів) Штами: IDAC 081111-06=SMCD 2215; IDAC 081111-03=SMCD 2210; IDAC 081111-02=SMCD 2208; IDAC 081111-01=SMCD 2206; IDAC 200312-06=SMCD 2204; IDAC 200312-05=SMCD 2204F (Фігури 1-6 і Таблиця 1).

Штам SMCD 2215 був спочатку виділений з ендосфітної бактерії *Phyaloccephala sensu lato* (рослинний ендосфітний SMCD гриб). Класифікація згідно з Labeda et al. [2012]. Це філогенетичне дослідження вивчає майже всі описані види (615 таксонів) сімейства Streptomycetaceae, виходячи з генетичних послідовностей 16S рДНК та демонструє видову різноманітність цього сімейства, в якому було виявлено наявність 130 клад, підтверджених статистично.

Отримані з послідовностей 16S рДНК дані підтверджують, що штам SMCD 2215 *Streptomyces* sp. можна віднести до окремої невідомої клади, згідно з [Labeda et al 2012], але до окремого від *Streptomyces lividans* виду.

Приклад 2

Симбіотичний взаємозв'язок між мікроорганізмом та рослиною і рівень їхньої сумісності

Рівень сумісності між мікроорганізмами і рослинами оцінювали за допомогою модифікованого способу Abdellatif et al. [2009]. На розділеній навпіл 10 см чашці з агаром, що не

містить поживних речовин (Фігура 7), оцінювали здоров'я рослин і формування ними кореневих волосків – абсорбентів води та мінеральних речовин, при спільному культивуванні, з або без мікробних партнерів. На Фігурі 7 ліва частина кожної з розділених чашок відображає культуру з мікробним партнером, а права частина кожної з розділених чашок відображає культуру без мікробного партнера. Експеримент був відтворений двічі в трьох повтореннях.

Як показано в лівих частинах кожної розділеної чашки, здорові рослинні тканини формувалися навіть тоді, коли коріння рослин були вирощені безпосередньо на щільних бактеріальних матах. Біомаса кореневих волосків збільшилася приблизно вдвічі, порівняно з правими частинами кожної з розділених чашок, де мікробний партнер був відсутній (див. на ліві частини).

Ефективність утвореного рослиною симбіотичного зв'язку залежить від типу розподілу ендоефітів в ендодермі коренів. Типова колонізація коренів ендоефітами переривчаста і неповна, з меншою (<50 %), в порівнянні з колонізацією патогенними грибами, кількістю зайнятих клітин (Таблиця 2), яка характеризується рівномірністю/безперервністю (частота: 60-80 %) колонізації клітин (Фігура 8).

Продуктивність ендоефіта не повинна оцінюватися виключно шляхом вимірювання виробництва біомаси тому, що основою значного підвищення врожайності є ефективність колонізації рослин ендоефітами. Це можна оцінити, характеризуючи їхній зв'язок з рослинними клітинами, тканинами або органами (тобто насінням та первинними коріннями) із застосуванням математичних Індексів, які були розроблені [Abdellatif et al. 2009] і які були застосовані в даному дослідженні (Фігура 9 і Фігура 10).

Ці Індеси ґрунтуються на наступних спостереженнях: ендоефітні симбіонти мають патерни колонізації первинного кореня (коренів) (регулярність або рівень відхилень форм ендоефітних клітин – Ireg та їхнього спрямування – Idir при колонізації живих клітин), відмінні від тих, які притаманні мертвим клітинам первинного кореня (які, зазвичай, залишаються колонізованими справжніми сапрофітами).

Високі значення індексів Ireg і Idir є ознакою взаємовигідних відносин симбіонт-рослина. Насамкінець, результати показують, що симбіотичні зв'язки мікроорганізм-рослина характеризуються високим рівнем сумісності між двома партнерами, що призводить до збалансованої (<50 % колонізовані клітини кори) і переривчастою колонізацією коренів мікробними ендоефітами, яка була виміряна за допомогою математичних індексів [Abdellatif et al. 2009]. Це взаємовигідне партнерство додатково характеризується прямим впливом ендоефітних мікроорганізмів на здоровий ріст (бакто- та мікозалежність), коли рослині важко використовувати мікробних партнерів виключно як джерело поживних речовин або енергії для росту. Крім того, спостерігали збільшення біомаси кореневих волосків завдяки впливу ендоефітів, яке виявлялося навіть у коренях, які перебували у віддалених частинах розділених чашок, де не було мікробних партнерів, що вказує на ймовірний системний ефект посилення росту ендоефітами.

Приклад 3

Симбіотичні органи ендоефітів на пшениці

Кожна таксономічна група ендоефітів встановлює унікальний тип міковіталізму, згодом формуючи різні симбіотичні органи. Характеристику міковіталізму проводили за допомогою Abdellatif et al. [2009] методики, що складається з in vitro ко-культивування насіння і мікроорганізму, що оцінює ранні етапи симбіотичних відносин мікроорганізм-рослина. Різноманітність мікробних симбіотичних органів, сформованих в проростках пшениці за участю SMCD 2204, 2206, 2210 і 2215, проілюстровано на Фігурі 11.

Підводячи підсумок всьому вищесказаному, результати демонструють, що формування кожним ендоефітом особливого типу симбіотичних органів в коренях пшениці, ймовірно, пов'язано з їхніми різними симбіотичними функціями. Рівномірна частота колонізації, осередкові патерни колонізації, збільшення септування гіф в живих клітинах кореня, а також формування арбускул, вузлів, завитків і бульбочок – передбачуваних функціональних симбіотичних органів – можуть бути ознаками місцевої спеціалізації грибних ендоефітів та можуть стимулювати формування міковітальності та мікогетеротрофності у рослин. Бактовітальність була представлена, в основному, скрученими міжклітинними філаментами, утвореними мікроорганізмом *Streptomyces*.

Симбіоз, сформований на рівні насіння, приводив до збільшення розмірів проростків пшениці через 10 днів після спільної інокуляції (Фігура 12 і Фігура 13).

Приклад 4

Ендоефіти покращують схожість насіння пшениці, які піддавали впливу теплового стресу і посухи

Проростання насіння являє собою надзвичайно важливу стадію для виживання рослини і своєчасного формування проростків, особливо в стресових умовах. Було висловлено припущення, що ендоефіти можуть покращувати схожість насіння, що перебувають під впливом теплового стресу і посухи. Модель гідротермального часу (НТТ) проростання являє собою концептуальну модель корисну для прогнозування часу та енергії проростання (EG) при заданому наборі умов. НТТ і EG застосовуються для визначення підвищення жаростійкості або посухостійкості пшениці, викликаного одним або більш сумісними ендоефітами. Перевірені ендоефіти призвели до різкого збільшення відсотка схожості, покращення показників EG і НТТ, та до зниження чутливості пшениці до підвищеної температури та посухи, що було визначено вимірами сирої ваги проростків. При колонізації найбільш успішним ендоефітом, значення параметрів які тестували в насінні пшениці та які зазнали вплив теплового стресу нагадували значення цих параметрів у насіння, що не зазнали стресу.

Матеріали та способи

Модель гідротермального часу проростання та енергії проростання

Модель гіпотермального часу [Gummerson 1986] постулює, що кожне окреме зерно починає проростати при дотриманні двох умов. По-перше, сума середніх добових температур, що перевищує мінімальне кардинальне значення (T_{min}), накопичених протягом деякого періоду часу, повинна подолати порогове значення (θ_T), яке вимірювали в градус-днях. По-друге, насіння повинні накопичити достатній водний потенціал (θ_H) на градус-день. Таким чином, НТТ (θ_{HT}) може бути представлена як:

$\theta_{HT} = (\theta_H) (\theta_T)$. (Рівняння 1)

згідно з Köchy і Tielbörger [2007],

$\theta_T = (T_{субстрата} - T_{min}) t$ (Рівняння 2)

де t відображає час, в днях, та

$\theta_H = \psi_{субстрата} - \psi_{min}$ (Рівняння 3)

при постійних умовах навколишнього середовища, за умови, що $T_{субстрата}$ дорівнює або нижче оптимальної для проростання насіння температури. У рівнянні 3, $\psi_{субстрата}$ і ψ_{min} позначають водний потенціал субстрату та мінімальний водний потенціал, при якому проростання можливо, в МПа, відповідно. Згідно з Bradford [2002], рівняння 2 і 3 можна підставити в рівняння 1 та отримати:

$\theta_{HT} = (\psi_{субстрата} - \psi_{min}) (T_{субстрата} - T_{min}) t$ (Рівняння 4).

Однак у цьому дослідженні температура перевищувала оптимальну для проростання пшениці температуру [розглянуто McMaster (2009)], у зв'язку з чим необхідно враховувати максимальну температуру (T_{max}), вище якої проростання неможливо. Таким чином, рівняння 2 було перетворено в:

$\theta_T = \sqrt{[(T_{субстрата} - T_{min}) (|T_{субстрата} - T_{max}|)]} t$ (Рівняння 5)

в якому $T_{min} \leq T_{субстрата} \leq T_{max}$. Якщо рівняння 5 замінити рівнянням 2, в рівнянні 4 отримаємо такі результати:

$\theta_{HT} = (\psi_{субстрата} - \psi_{min}) \sqrt{[(T_{субстрата} - T_{min}) (|T_{субстрата} - T_{max}|)]} t$ (Рівняння 6)

в якому $T_{min} \leq T_{субстрата} \leq T_{max}$.

Енергія проростання (EG) може бути визначена кількома способами, в тому числі по співвідношенню відсотка насіння, що проростає після певного періоду часу після посадки, до загальної кількості насіння, яке тестувалось [Ruan et al. 2002; Dong-dong et al. 2009], або досягненню 50 % схожості [Allen, 1958]. Для того, щоб поєднати EG з моделлю проростання НТТ використовується останнє визначення, це означає, що EG дорівнює t в рівнянні 2.

Оцінка параметрів

Оцінка T_{min} і T_{max} пшениці була заснована як на інформації, отриманої з літератури, так і на власних спостереженнях винахідників. McMaster [2009] узагальнив дані, взяті з Friend et al. [1962], Cao і Moss [1989] та Jame et al. [1998], які вказують на існування криволінійної залежності між швидкістю розвитку пшениці та температурою. Оскільки проростання і розвиток пшениці не відбувається при температурі нижче ніж 0°C або вище ніж 40°C, T_{min} і T_{max} були привласнені значення 0°C і 40°C, відповідно.

Параметр ψ_{min} оцінювали в умовах *in vitro* на проростаючому насінні пшениці, що культивували на картопляно-декстрозному агарі (КДА, Difco), який містить поліетиленгліколь (ПЕГ) 8000 в діапазоні концентрацій (Amresco Inc.). Активність води (a_w) КДА без добавок та КДА, що містить 8 %, 12 % і 16 % ПЕГ, була виміряна за допомогою AquaLab 4TE, Series 4 Quick Start, Decagon Devices. Активність води була конвертована у водний потенціал (ψ), використовуючи співвідношення, адаптоване Bloom і Richard [2002]:

$\psi = [(RT) \ln(a_w)] / V$ (рівняння 7)

в якому R являє собою універсальну газову константу (8,314 Дж моль⁻¹ К⁻¹), T являє собою

температуру в °K, і V являє собою парціальний молярний об'єм води (18 мл/моль). Для перетворення одиниць виміру, $1 \text{ Дж/мл} = 1 \text{ МПа} = 10 \text{ бар}$. Водний потенціал дорівнює нулю для вільної поверхні води або насиченого середовища; всі інші значення негативні.

Активність води в КДА і КДА, що містить 8 %, 12 % і 16 % ПЕГ, була 0,9974, 0,9890, 0,9863 і 0,9825, відповідно. Ці значення еквівалентні -0,35, -1,51, -1,88 і -2,41 МПа, відповідно, що узгоджується з літературними даними [Leone et al. 1994].

Рослинні та грибні матеріали

В якості рослинних матеріалів використовували сорт твердої пшениці AC Avonlea, який має низьку стійкість до екологічного стресу [SaskSeed guide 2008]. Насіння, яке використовували на першому етапі експериментів, було вироблено Paterson Grain в 2008 році, в польових умовах, і не було сертифіковано на відсутність в них мікробів. Насіння, яке використовували на другій стадії експериментів, було вироблено Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC) Seed Increase Unit Research Farm в 2006 році в умовах оранжереї, та було сертифіковано на відсутність в них мікробів. Поверхню насіння пшениці стерилізували 95 % етанолом протягом 10 с, насіння промивали у стерильній дистильованій воді протягом 10 с, занурювали на 3 хв (перший етап експериментів з несертифікованими на відсутність мікробів насінням), або на 1 хв (другий етап експериментів зі сертифікованими на відсутність мікробів насінням) в 5 % натрій гіпохлориту (Javex), промивали три рази в стерильній дистильованій воді і КДА для їхнього проростання [Abdellatif et al. 2009]. Третій спосіб стерилізації насіння, що включає витримку в хлорі (газоподібному) протягом 3 год. (отриманого шляхом змішування в склянці 25 мл 6 % натрій гіпохлориту з 1,0 мл концентрованої соляної кислоти) в закритій пластмасовій коробці, яку поміщали в витяжну шафу [Rivero et al. 2011], також перевіряли. Відсоток схожості насіння, яке проводили крізь різні протоколи стерилізації та розміщених на КДА на три дні, проілюстровані на Фігурі 14В. Тільки 3-хвилинне занурення в натрій гіпохлорит призводило до значного зниження схожості ($p \leq 0,01$). Поверхнева стерилізація насіння була здійснена для усунення мікробів, які можуть конкурувати з досліджуваними ендоситами. Крім того, мікроорганізми, присутні на поверхні насіння, могли поширитися за межі чашки та проростків, інгібуючи ріст рослин. Усе насіння, яке використовували в дослідженні, розглядали як те, що не містить мікроорганізмів, на підставі відсутності випадкового росту мікробів на чашці.

Чотири мітоспорових ендоситних гриба відділу Ascomycota (систематизованих згідно з Kifferand and Morelet [2000]): SMCD 2204, SMCD 2206, SMCD 2208 і SMCD 2210, а також виділені ниткоподібні грампозитивні бактеріальні актиноміцети (Actinomycetes) SMCD 2215; сумісні з *Triticum turgidum* L. [Abdellatif et al. 2009] були використані в даному дослідженні. Ендосити вирощували на КДА протягом щонайменше трьох днів при кімнатній температурі в темряві до використання в експерименті.

Ендосити як вільноживучі організми

Агарові пластинки (5 мм^2), вирізані з країв материнської колонії, були розміщені в центрі 90 мм чашки Петрі, що містить або КДА без добавок, або з додаванням 8 % ПЕГ (модель посухи). Чашки Петрі герметизували парафільмом (Pechiney Plastic Packaging) для підтримки стерильності та поміщали в настільний інкубатор (Precision Thermo Scientific, модель 3522) при 23°C , або в умовах теплового стресу, при 36°C , в темряві. Діаметр колоній вимірювали через 24, 48, 72, 96 годин і на п'ятий та шостий день. Зміни в діаметрі були використані для розрахунку швидкості росту колоній. Ростові параметри вимірювали як мінімум з трьома повтореннями для кожного ізоляту.

Властивості ендоситів збільшувати жаро- і посухостійкість пшениці

Кожен ізолят наносили на насіння пшениці окремо, перед проростанням згідно зі способом, описаним в Abdellatif et al. [2010] та проілюстрованим на Фігурі 14А. Якщо стисло, п'ять поверхнево-стерилізованих насінин були розміщені на відстані від 5 мм^2 агарової пластини, еквівалентному 48 годинам росту гіф, поміщали покритою гіфами стороною донизу в центр 60 мм чашки Петрі. Для забезпечення потреб повільно зростаючих штамів, агарові пластинки з колоніями ендоситів поміщали в чашку Петрі в період від одного до чотирьох днів, що передують їхньому введенню в насіння. Проростки пророщували протягом одного тижня під впливом абіотичних стресів, та в контрольних умовах.

Посуха була індукована за допомогою КДА, який містить 8 % ПЕГ. Тепловий стрес був індукований в настільному інкубаторі в умовах темряви; кожні 2 години температуру піднімали на 2°C , таким чином вона була поступово збільшена з 28°C до 36°C . На початкових етапах експериментів проводили вимірювання відсотка схожості на третю добу та сирої ваги через один тиждень. Кожен експеримент включав шість чашок Петрі і був тричі незалежно повторений. У наступних експериментах відсоток схожості оцінювали кожні 24 години протягом семи днів. Кожен експеримент включав 10 чашок Петрі та експеримент повторювали або два

рази (поєднання посухи і теплового стресу) або три рази (тепловий стрес, посуха і контрольні умови).

Стійка внутрішня колонізація коренів пшениці прогнозованими ендоефітами була підтверджена за допомогою повторної ізоляції ендоефітів з коренів, поверхню яких, для запобігання росту зовнішніх мікроорганізмів, стерилізували з використанням модифікованої процедури за Larran et al. [2002]. Фрагмент кореня (~ 0,5 см) поверхнево стерилізували в 95 % етанолі протягом 10 с, корінь промивали у стерильній дистильованій воді протягом 10 с, занурювали на 20 с в 5 % розчин натрій гіпохлориту (Javex), промивали три рази в стерильній дистильованій воді і поміщали на КПА в чашці Петрі діаметром 60 мм. Чашку Петрі герметизували парафільом та інкубували в темряві при кімнатній температурі в період від чотирьох до семи днів до експерименту.

Аналіз статистичних даних

Темпи росту колоній вільноживучих ендоефітних організмів, вирощених в умовах теплового стресу або посухи, порівнювали зі значенням даного параметра тих же організмів, вирощених у контрольних умовах з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим застосуванням post-hoc тесту з найменшою істотною різницею (LSD) Фішера. Дані, що стосуються значень відсотка схожості, до статистичного аналізу піддавали арксинус-перетворенню [McDonald 2009]. Статистичні відмінності між значеннями відсотка схожості після трьох та після семи днів, і значеннями сирової ваги протягом семи днів були оцінені із застосуванням однофакторного аналізу ANOVA для співставлення всіх впливів. Згодом, для оцінки значущості відмінностей між безендоефітним контролем і насінням, обробленим кожним з ендоефітів застосовували post-hoc LSD аналіз. Рівень статистичної значущості відмінностей між EG і НТТ, необхідних для досягнення 50 % схожості колонізованих ендоефітів та контрольного насіння, були оцінені шляхом обчислення EG при кожному з трьох незалежних повторів експерименту. Отримані дані були піддані ANOVA і post-hoc LSD аналізу. Значення Р менш ніж 0,05 і 0,01 оцінювали як значущі та дуже значущі, відповідно. Статистичний аналіз проводився програмою SPSS Inc. 2011.

Результати

У кожній секції результати були систематизовані згідно з типом стресових факторів: тепловий стрес, посуха, тепловий стрес у комбінації з посухою або відсутність стресу. У кожному типі стресу результати, що стосуються рослинних матеріалів, були представлені згідно проросткам та/або вимірними характеристикам проростків: відсоток проростання на третій і сьомий день, сира вага на сьомий день, EG і НТТ.

Вільноживучі ендоефіти

Фенотипи SMCD 2206, 2210 і 2215 не були змінені спекою (36°C), у той час як SMCD 2204 і 2208 не росли при 36°C. Темпи росту колоній SMCD 2206 і 2210 знизилися при 36 °C, у порівнянні з не стресовими умовами ($p \leq 0,01$), у той час як темпи росту SMCD 2215 при 36 °C підвищилися ($z \leq 0,05$) (Фігура 15). При 36 °C SMCD 2215 ріс найбільш швидко, а за ним, у порядку убавання, йдуть 2206 та 2210 (Фігура 15).

Морфологія SMCD 2204, 2206, 2208 і 2215 була помітно змінена посухою (8 % ПЕГ). Однак, коли SMCD 2210 піддавали впливу посухи, цей організм втратив свій "шерстистий" зовнішній вигляд і натомість придбав "блискучий" або "слизовий" зовнішній вигляд. Темпи росту колоній SMCD 2204, 2206 і 2208 були знижені посухою ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ відповідно), в той час як темпи росту колоній всіх інших ендоефітів залишилися незмінними (Фігура 15). Під впливом посухи найвищим темп росту був у SMCD 2204, а за ним, у порядку убавання, йдуть: 2206, 2210, 2208 і 2215 (Фігура 15).

При одночасному впливі 36 °C спеки та посухи (8 % ПЕГ), SMCD 2204 та 2208 перестали рости, у той час як SMCD 2206, 2210 і 2215 росли значно повільніше, ніж в контрольних умовах ($p \leq 0,01$) (Фігура 15). У контрольних умовах SMCD 2204 ріс найбільш швидко, за ним, у порядку убавання, йшли: SMCD 2206, 2210, 2208 і 2215 (Фігура 15).

Реакція колонізованої ендоефітами пшениці на високі температури

При 36 °C колонізація мікроорганізмами SMCD 2206 і 2215 призвела до збільшення схожості по закінченні трьох днів ($p \leq 0,05$ і $p \leq 0,01$, відповідно; Фігура 16А), у той час як SMCD 2204, 2208 та 2210 не викликали змін значення цього параметра ($p > 0,1$; Фігура 16А). По закінченню шести днів, проросло 63 % і 56 % насіння, культивованого разом з SMCD 2204 і 2208, відповідно. Ці значення статистично не відрізнялися ($p > 0,1$) від 59 % схожості, досягнутої не колонізованим контролем. Навпаки, ендосимбіонти SMCD 2206, 2210 і 2215 стимулювали проростання, за результатами семи днів ($p \leq 0,01$; Фігура 17).

Під впливом 36 °C сира вага проростків пшениці, культивованих разом з 2204, 2206, 2208 та 2210, не змінилася, у той час як SMCD 2215 значно підвищив значення цього параметра ($p \leq$

0,01, відповідно; Фігура 16D).

EG насіння, культивоване при 36°C разом з грибними ендofітами SMCD 2210 ($p \leq 0,05$; Таблиця 3, Фігура 17), була вищою, ніж у насіння, що не містить ендofіти. Однак SMCD 2204, 2206, 2208 і 2215 не змінили значення EG ($p > 0,1$; Таблиця 3), у порівнянні з контролем. SMCD 2210 збільшив EG найбільшою мірою, за ним йшли SMCD 2206 і 2215 (Таблиця 3). SMCD 2210 знизив час, необхідний для проростання 50 % насіння, всього лише до 2 днів.

Під впливом теплового стресу НТТ, необхідна для проростання, була зменшена у насінні пшениці, колонізованому SMCD 2210 ($p \leq 0,05$; Таблиця 3), але не була змінена будь-яким іншим із ендofітів, які перевірялись ($p > 0,1$; Таблиця 3). Насінню, яке не містить ендofітів, для досягнення 50 % схожості, знадобилося на 50 МПа °C днів більше, ніж насінню, яке було колонізоване SMCD 2210 (найбільш результативний з протестованих ендofітів) (Таблиця 3). Була виявлена пряма негативна кореляція між НТТ, яка необхідна для досягнення 50 % проростання, і відсотком схожості після закінчення семи днів, що були проведені під впливом теплового стресу (Фігура 18).

Відповідь колонізованої ендofітами пшениці на посуху

Під впливом посухи протягом трьох днів відсоток схожості культивованого разом з SMCD 2208 насіння пшениці знизився, порівняно з насінням, що не містить ендofітів ($p \leq 0,01$; Фігура 16B), у той час як SMCD 2204, 2206, 2210 і 2215 не змінили значення цього параметра ($p > 0,1$; Фігура 16B). Обробка насіння ендofітами SMCD 2206, 2210 і 2215 призвела до підвищення схожості через сім днів ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ і $p \leq 0,01$, відповідно; Фігура 17). На відміну від цього, 65 і 67 % насіння культивоване разом з SMCD 2204 та 2208 проросли по закінченню семи днів. Жодне з цих значень статистично значуще не відрізнялося від значення 59 %, досягнутого не колонізованим насінням, яке проросло в подібних умовах ($p > 0,1$). В умовах посухи, по закінченню семи днів SMCD 2208 та 2210 знизили сиру вагу ($p \leq 0,05$ і $p \leq 0,01$, відповідно; Фігура 16E). Жоден з решти мікобіонтів не змінив значення цього параметра ($p > 0,1$; Фігура 16E).

EG знизилася в насінні пшениці, що культивовано з усіма тестованими ендofітами, порівняно з насінням, що не містить ендofітів ($0,05 < p \leq 0,1$ для SMCD 2204 і 2208, і $p \leq 0,05$ для 2206, 2210 і 2215; Таблиця 3). SMCD 2206 поліпшив значення EG найбільшою мірою, зменшуючи час, необхідний для досягнення 50 % проростання, яке було досягнуто через 2,6 дні (Таблиця 3; Фігура 17).

В умовах посухи НТТ, необхідна для проростання, зменшилася у насінні пшениці, яке оброблене всіма тестованими ендofітами (Таблиця 3). В той час, коли не колонізованому насінню для досягнення 50 % проростання було необхідно 80 МПа °C днів, насінню, яке колонізоване ендofітами SMCD 2206 (найбільш продуктивний з перевірених ендofітів), було потрібно всього лише 34 МПа °C днів, тим самим знижуючи потребу на 46 МПа °C днів (Таблиця 3). Була виявлена помітна негативна лінійна кореляція між НТТ, яка необхідна для досягнення 50 % проростання, і відсотком схожості на сьому добу під впливом посухи (Фігура 18). Проте, значення пов'язане з цією лінійною залежністю R^2 було меншим, ніж у випадку зі знайденої при тепловому стресі кореляцією. Діапазони НТТ, що необхідні для досягнення 50 % схожості, різняться під впливом теплового стресу і посухи, унікальні для насіння, яке зазнало посуху та тепловий стрес, і мають значення від 34 до 44 МПа °C днів і від 80 до 94 МПа °C днів, відповідно (Фігура 18; Таблиця 3). Діапазони значень відсотка схожості по закінченню семи днів подібні для насіння, що піддане посузі, та насіння, яке було під впливом тепла, хоча значення відсотка схожості насіння, яке було під впливом теплового стресу, охоплюють дещо більший діапазон (Фігура 18).

Реакція колонізованої ендofітами пшениці на дію комбінації спеки та посухи

Лише невелика кількість насіння пшениці проросло під спільним впливом посухи (8 % ПЕГ) і теплового стресу (36°C) (Фігура 17). Колонізація ендofітами SMCD 2210 і 2215 після закінчення декількох днів збільшила відсоток схожості ($p \leq 0,01$; Фігура 17). З іншого боку, SMCD 2204, 2206 і 2208 не змогли покращити значення цього параметра ($p > 0,1$). Насіння, яке культивували спільно з SMCD 2215 (мікроорганізм, який найбільш сприятливий за результатами тестування), досягло 24 % значення схожості, що в чотири рази вище від рівня, досягнутого його аналогами – вільноживучими ендofітами (Фігура 17).

EG не може бути визначена, а НТТ була розрахована для 5 %, проте не для 50 % схожості, оскільки ні не колонізоване насіння, ні насіння, колонізоване будь-яким з ендofітів, не досягло схожості в 50 % протягом семи днів. Час, необхідний для досягнення 5 % схожості, був в діапазоні від 24 годин до чотирьох днів. Жоден з протестованих ендofітів не зменшив час, необхідний для досягнення 5 % схожості, або значення НТТ ($p > 0,1$). В цілому, НТТ, яка необхідна для досягнення 5 % схожості, варіювала в діапазоні від 11 до 43 МПа °C днів

(НТТ_{середнє} = 23,9) (Фігура 18; Таблиця 3).

Діапазон значень НТТ для насіння, які були під впливом теплового стресу і посухи був унікальним, якщо порівнювати його зі значеннями НТТ, які отримані при впливі підвищеної температури чи посухи окремо. Був виявлений лінійний негативний взаємозв'язок між необхідним НТТ та відсотком схожості при комбінованому впливі теплового стресу і спеки. Тим не менше, значення пов'язаного з цією лінійною залежністю параметра R^2 було меншим, ніж у випадку з кореляцією, виявленої при впливі теплового стресу і посухи окремо (Фігура 18).

Реакція колонізованої ендofітами пшениці на контрольні умови

По закінченні трьох днів SMCD 2215 значно збільшував схожість насіння при не стресових умовах, в порівнянні з не колонізованим насінням ($p \leq 0,01$) (Фігура 16C). SMCD 2206, 2208 та 2210 позитивно впливали на відсоток схожості, у той час як SMCD 2204 не змінив його значення. У не стресових умовах SMCD 2204, 2210 і 2215 збільшили сиру вагу за сім днів ($p \leq 0,05$ і $p \leq 0,01$, відповідно). Однак SMCD 2206 і 2208 не мав ніякого впливу на зміну сирої ваги, у порівнянні з не колонізованими проростками (Фігура 16F).

У контрольних умовах значення параметрів EG і НТТ були злегка покращені ендofітами SMCD 2206 і 2215 (Таблиця 3). Спільне культивування насіння пшениці з різними ізолятами пов'язують з відносно невеликою зміною в значеннях параметрів EG і НТТ.

Приклад 5

Ендofіти підвищували врожайність пшениці і ячменю в умовах сильної посухи

Короткий опис. У зв'язку зі зміною клімату і росту чисельності населення, удосконалення методів, що підвищують стійкість сільськогосподарських культур до стресових умов є надзвичайно важливим. Інокуляція трьома симбіотичними ендofітами, аборигенними для канадських прерій, призводить до підвищення стійкості пшениці та ячменю до посухи та теплового стресу, а також до збільшення ваги насіння та врожаю зернових. Використання в цій сфері подібних грибних та бактеріальних ендofітів створює потенціал для збільшення енергії проростання насіння (SGV = різниця між загальним процентом Е- проростаючого насіння і Е + проростаючого насіння) (Фігура 19, Фігура 20 А і В), а також для підвищення врожайності в потенційно стресових умовах (Таблиця 4; Фігура 21 А, Ва і Вb). Дані підтверджують, що штамми SMCD підвищують життєздатність насіння та силу рослин (Фігура 22A-D). В цілому, результати показують, що пренатальний догляд за насінням із застосуванням ендofітних мікроорганізмів, зокрема SMCD штамів, забезпечує найвищу врожайність пшениці і ячменю, завдяки покращенню фізіологічних параметрів.

Матеріали та способи

Насіння пшениці та ячменю були вироблені на експериментальних ділянках Університету Саскачевану (University of Saskatchewan) і в Crop Science Field Laboratory (Saskatoon). Візуально здорове насіння поверхнево стерилізували в 95 % етанолі протягом 10 с, насіння промивали у стерильній дистильованій воді протягом 10 с, занурювали в 5 % розчин натрій гіпохлориту (Javex) на 1 хв, а потім промивали три рази в стерильній дистильованій воді.

Ендofітні ізоляти, що використовували в даному дослідженні, були спочатку виділені з коренів твердих сортів пшениці *Triticum turgidum* L., вирощеної на польових ділянках в провінції Саскачеван, Канада [Vujanovic 2007b]: SMCD 2204, 2206, 2208, 2210, 2215. Усі отримані ендofітні ізоляти культивували на картопляно-декстрозному агарі (КДА, Difco), за відсутності рослини-хазяїна. До використання у експерименті, ізоляти вирощували на КДА в темряві при кімнатній температурі (23 °C) протягом трьох днів.

Експериментальну інокуляцію проводили в вегетаційних посудинах. Кожен з наявних ендofітних ізолятів наносився на насіння злаків (пшениці та ячменю) до їхнього проростання, згідно способу, описаному в Abdellatif et al. [2010]. Коротко, п'ять насінин, поверхня яких була стерилізована, були розміщені на відстані, еквівалентній 48 годинам росту гіф, від агарової пластинки площею 5 мм², розташованої покритою гіфами стороною донизу, в центрі 2 л пластикової культуральної посудини, наповненої 300 г (суха вага) вологої ґрунтової суміші Sunshinemix 4, що була автоклавована. Потім насіння і агарову пластинку покривали 3,5-4,0 см шаром ґрунтової суміші Sunshine mix 4. Насіння, оброблене ендofітами одного типу, розсаджували по 12 посудинам, в кожену посудину поміщали по 5 насінин. Горщики, що містять рослини, поміщали в оранжерею, для створення умов посухи та здійснення контролю обробки. Горщики були розміщені блоками, в довільному порядку.

Індукцію посухи проводили в період з травня по вересень, коли максимальна добова температура в оранжереї коливалася в діапазоні від 18 до 26 °C. У сонячні дні, освітлювали природним сонячним світлом, а в похмурі дні або зимові дні, що мають укорочений фотоперіод, в якості додаткового джерела освітлення застосовували 1000 Вт натрієві лампи, підвишені до стелі на висоті близько 2 м над рослинами. У першому експерименті рослини, які зазнали

посуху й контрольні (які добре поливали), вирощували при 25 % масової вологості ґрунту та 100 % вологоємності, відповідно. У ході експерименту контрольні рослини поливали до доведення значення вологоємності ґрунту до 100 %, три рази на тиждень, у той час як рослини, які піддавали посусі, поливали раз на тиждень, до доведення значення вологоємності ґрунту до 100 %. Такий режим посухи був встановлений для імітування природного циклу протікання посух, які можуть виникати в північноамериканських преріях під час вегетації [Chipanshi et al. 2006].

Проводили збір зрілих колосків, а сухі зерна зважували в лабораторії за допомогою ваг Mettler Toledo PG802-S.

Результати та їхнє обговорення

Збільшення сили проростання насіння пшениці (SGV)

У контрольних умовах *in vitro* насіння пшениці, оброблене SMCD (2204, 2206, 2208, 2210, 2215), проростало швидше, більш рівномірно і з набагато більш високим значенням SGE (ефективності проростання насіння). SGV насіння, інокульованого SMCD (E+), був вище на 15-40 %, порівняно з необробленими (E-) насінням (Фігура 19), демонструючи тим самим ефективність регулювання SMCD періоду спокою насіння і збільшення енергії проростання насіння. Також було показано позитивний вплив штамів SMCD на врожайність пшениці і ячменю при сильній посусі.

Як правило, ячмінь мав більш високу чутливість (низькі показники DTE (Drought Tolerance Efficacy)) і нижчу врожайність, ніж у пшениці (Таблиця 4), можливо, через те, що умови гострої посухи в теплиці більш сприятливі для пшениці. Зокрема, дворядний ячмінь CDC Kendall, який не містить ендоефітів (E-), мав більш високу, ніж у інших представників ячменю, чутливість до посухи. Тим не менш, обробка ендоефітами (E+) надає сильний позитивний ефект на врожайність всіх генотипів (Таблиця 4). Придбана стійкість коливалася в діапазоні від низької стійкості у CDC Kendall до високої стійкості у New Dale, тимчасом як придбана стійкість пшениці була незмінно високою.

На стадії зрілості пшениці і ячменю ендоефіти SMCD викликали у них сильний ріст значень таких показників посухостійкості, як ефективність DTE та врожайність. Застосування SMCD на Avonlea, найбільш чутливого до посухи сорту пшениці з виявлених (DTE=16,1), привело до сильного зростання врожайності (77 %) в умовах посухи, у порівнянні з контролем, або стандартним поливом. Пшениця сорту Carberry витягла найбільшу вигоду з ендоефітів у контрольних (нормальних) умовах, в той час як CDC Utmost VB і BW 423 проявляли себе однаково добре і в умовах посухи, і в контролі.

Насамкінець, поєднання посухостійких генотипів з сумісними до них ендоефітними мікробними симбіонтами рослин SMCD 2206, SMCD 2210, і SMCD 2215 призводить до збільшення посухостійкості, важливого для забезпечення продовольчої безпеки аспекту. Не бажано обмежуватися теорією, це говорить про те, що взаємозв'язок з симбіонтами був найбільш вигідною для найбільш сприйнятливих до посухи (низькі значення DTE) сортів пшениці (Фігура 19A) і ячменю (Фігура 19B) під впливом на них посухи.

Єдиним виявленим винятком був шестирядний ячмінь сорту Legacy, який продемонстрував надзвичайно низький DTE=1,1. Незважаючи на те, що в контрольних умовах в присутності ендоефітів, він продемонстрував позитивне підвищення врожайності на 26,9 %, при посусі симбіоз привів до збільшення його врожайності всього лише на 5 %. Тому цей сорт був виключений з моделі для ячменю, яка проілюстрована на Фігурі 19B.

Вплив окремих штамів SMCD на продуктивність пшениці і ячменю

Окремі штами SMCD мали позитивний вплив на середню врожайність кожного сорту, хоча фактичні значення цієї величини залежали від конкретної комбінації штам-сорт. Фігура 21 ілюструє результати, отримані в умовах посухи в теплиці (Фігура 21: A -Пшениця; B_a-Ячмінь (дворядний), і B_b-ячмінь (шестирядний)).

Ранній контакт насіння з сумісними з ними SMCD ізолятами є передумовою для захисту від посухи сільськогосподарських культур, результатом чого є збільшення врожайності, чи продуктивності, зернових. SMCD 2206, як правило, викликав найбільш сильні покращення у більшості сортів. Все ж, найбільш сильні індивідуальні покращення були обумовлені специфічними взаємовідносинами штам-сорт, наприклад Пшениця-PT580 і Ячмінь-CDC Copeland воліли SMCD 2210; у той час як Пшениця-BW423 і PT580, а також CDC Kendall демонстрували найбільшу продуктивність та стійкість до посухи при інокуляції SMCD 2215.

Результати підкреслюють важливість міковіталізму для насіння пшениці та ячменю, яке перебуває у стресових умовах, допомагаючи селекціонерам у створенні високопродуктивних сортів, здатних витримувати умови посухи значно краще, ніж будь-який з сортів без допомоги ендоефітів (Фігура 22: A-D). Виходячи з продемонстрованої ефективності SMCD штамів у

польових умовах, селекціонери, для захисту врожаю, зможуть створити симбіотичні рослинні продукти, та агробізнес буде отримувати вигоду від отримання гарантованого рівня позитивного прибутку від врожаю, незалежно від змін умов навколишнього середовища.

Приклад 6

Експериментальне відтворення теплового стресу на бобових у фітотроні

Цей експеримент був проведений в умовах фітотрону. Всі сорти насіння, інокульовані та не інокульовані ендofітами (SMCD 2204F, SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2215), висаджували в вегетаційні посудини, що містять ґрунтову суміш. Детальна інформація про підходи, які застосовуються при інокуляції рослин ендofітами були описані раніше в Прикладі 5. Посудини, що містять рослини, які будуть рости в умовах теплового стресу, були поміщені в ростову камеру фітотрону Conviron PGR15 (Controlled Environments Ltd.), використовуючи метод випадкових блоків. Для теплового стресу була обрана температура близько 33°C. На рослини впливали цією температурою протягом 8 годин, після чого рослини піддавали дії температури в 21°C протягом від 16 годин до 10 днів. Після впливу теплового шоку, температуру змінювали до значення в 16°C на 8 годин і 21°C на 16 годин.

Результати

Коротко, результати показують, що ефективність збільшення жаростійкості кожним з протестованих ендofітів залежить від конкретної рослини, або хазяїна ендofіта (А-нут, В-сочевиця і С-горох), і що збільшення загальної біомаси залежить для окремих конкретних органів рослини, таких як: стручок (Фігура 23), стебло (Фігура 24) і корінь (Фігура 25), на які тепловий стрес діє по-різному.

SMCD 2215, у більшості випадків, збільшував біомасу стебла та стручків у гороху, та біомасу кореня у нуту. SMCD 2206 викликав збільшення біомаси стебла та стручків у сочевиці, та біомаси коренів у нуту, гороху і сочевиці. SMCD 2210 збільшував в основному біомасу стебла та стручків у нуту, та біомасу коренів у гороху. SMCD 2204F збільшував біомасу стручків у більшості протестованих культур (у нуту, гороху та сочевиці). Найбільш продуктивна комбінація ендofіт-сорт (Е+) збільшувала біомасу стручків, стебел і коріння на рівні 300 %, у порівнянні з контролем, який піддавали впливу теплового стресу та який не містив ендofітів (Е-).

Стебло: такі ендofіти продемонстрували найбільш продуктивну відповідну реакцію на тепловий стрес: Нут: Amit: SMCD 2210. Vanguard: SMCD 2204F; Горох: Golden: SMCD 2215. Handel: SMCD 2215; та Сочевиця: Glamis: SMCD 2206. Sedley: SMCD 2206.

Стручки: такі ендofіти продемонстрували найбільш продуктивну відповідну реакцію на тепловий стрес: Нут: Amit: SMCD 2210. Vanguard: SMCD 2204F; Горох: Golden: SMCD 2204F. Handel: SMCD 2215; Сочевиця: Glamis: SMCD 2206. Sedley: SMCD 2204F.

Корінь: такі ендofіти продемонстрували найбільш продуктивну відповідну реакцію на тепловий стрес: Нут: Amit: SMCD 2215. Vanguard: SMCD 2206; SMCD 2215; Горох: Golden: SMCD 2210; SMCD 2215. Handel: SMCD 2206; Сочевиця: Glamis: SMCD 2206; Sedley: SMCD 2204F.

Приклад 7

Експеримент по відтворенню в оранжереї посухи у бобових

У даному дослідженні використовували насіння шести сортів [Amit, Vanguard (нут), Golden, Handel (горох) і Glamis, Sedley (сочевиця)] та ендofіти SMCD 2204, SMCD 2204F, SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2215. Дані експерименти проводилися в оранжереї. Після інокуляції ендofітів та посіву насіння, для імітації сильної посухи, вегетаційні посудини залишили без води на 14 днів, як було запропоновано Charlton et al. [2008] та згідно з методикою та умовами, викладеними Gan et al. [2004].

Результати

В цілому, результати показують, що кожен штам SMCD позитивно впливає на деякі сільськогосподарські параметри: формування стручків або врожайність (Фігура 27), біомасу стебел (Фігура 26) і коренів (Фігура 28) у нуту (А), гороху (В), сочевиці (С) в умовах посухи. В цілому, сорти сільськогосподарських культур, після їхньої колонізації симбіотичними ендofітами (Е+), ставали більш стійкими до посухи, ніж до теплового стресу. Рівень ефективності протестованих ендofітів у забезпеченні посухостійкості варіював у різних органах рослин: вихід стручків був значно збільшений ендofітами SMCD 2204 у Glamis, SMCD 2204F у Vanguard, SMCD 2206 у Sedley, SMCD 2210 у Golden і SMCD 2215 у Handel.

Стебло: такі ендofіти продемонстрували найкращу відповідь на посуху: Нут: Amit: SMCD 2204F, Vanguard: SMCD 2206; Горох: Golden: SMCD 2204, Handel: SMCD 2204; SMCD 2210; SMCD 2215; Сочевиця: Glamis: SMCD 2204F; SMCD 2206. Sedley: SMCD 2204F; SMCD 2206.

Стручки: такі ендofіти продемонстрували найкращу відповідь на посуху: Нут: Amit: SMCD 2204; SMCD 2210. Vanguard: SMCD 2204; SMCD 2206; SMCD 2215; Горох: Golden: SMCD 2210;

SMCD2215. Handel: SMCD 2204F; SMCD 2206; SMCD 2215; Сочевиця: Glamis: SMCD 2204F; SMCD 2206. Sedley: SMCD 2210; SMCD2215.

Корінь: такі ендоефіти продемонстрували найкращу відповідь на посуху: Нут: Amit: SMCD 2204; SMCD 2215. Vanguard: SMCD 2204F; SMCD 2206; Горох: Golden: SMCD 2204F; SMCD2215. Handel: SMCD 2204F; Сочевиця: Glamis: SMCD 2204F; SMCD 2206; SMCD 2210. Sedley: SMCD 2206; SMCD 2210.

Приклад 8

Streptomyces sp. SMCD 2215 збільшував активність бактерій роду *Rhizobium* та частоту утворення бульбочок у гороху, який перебував під впливом теплового стресу.

10 Як нещодавно було відзначено, інші види *Streptomyces*, *S. lydicus* WYEC10 [Tokala et al. 2002], *Streptomyces* sp. nov. SMCD2215 колонізують коріння молодих проростків гороху з насіння, отриманих з рослин, які були вирощені у контрольних умовах. Це призводить до специфічних змін, таких як посилення цвітіння та врожайності стручків (Фігура 29) та збільшення формування бульбочок на коренях бактерією роду *Rhizobium* sp. (Фігура 30), природним ендоефітним колонізатором насіння гороху, відкритим в цьому дослідженні (Таблиця 5).

15 Вегетативні гіфи *Streptomyces* sp. nov. SMCD2215 колонізували клітини бульбочок, які розвиваються, що було виявлено при культивуванні на чашках (КДА), флуоресцентною мікроскопією (Carl Zeiss Axioskop 2) та ПЛР ампліфікацією (BioRad) [Schrey, Tarkka 2008].

Приклад 9

20 Ендоефіти збільшують стійкість бобових до абіотичних стресів шляхом збільшення життєздатності насіння

Бобові культури відносять до групи, що складається з більш ніж шістдесяти різних зернобобових культур з усього світу. Насіння бобових відіграють важливу роль у харчуванні людей. Основними обмежуючими факторами при вирощуванні бобових є біотичні та абіотичні стресові фактори, такі як посуха, спека, холод та засоленість. Останні дослідження показують, що взаємодія між ендоефітним мікроорганізмом та рослиною являє собою ефективний визначний фактор адаптації рослин.

У цьому дослідженні виноситься гіпотеза, згідно з якою ендоефіти збільшують швидкість та рівномірність проростання насіння *in vitro* в оптимальних та стресових умовах. Метою було, по-перше, зробити оцінку притаманної ендоефітам здатності запускати проростання та, по-друге, оцінити ефективність формування викликаного ендоефітами жаро- та посухостійкості у представників бобових.

Матеріали та способи

35 Два сорти представників бобових, Glamis (сочевиця) і Handel (горох), культивували спільно з SMCD 2206 і SMCD 2215, штамми симбіотичних ендоефітних грибів і бактерій, відповідно. Здатність ендоефітів індукувати стресостійкість у представників сортів Golden (Фігура 31) і Handel (Фігура 32) перевіряли шляхом пророщування *in vitro* насіння при моделюванні умов посухи (6 % PEG) та високої температури (33 °C).

40 Поверхню насіння стерилізували 95 % етанолом протягом 20 секунд, двічі промивали стерильною дистильованою водою протягом 10 секунд, після чого поміщали на 2 хвилини в 3 % розчин натрій гіпохлорит (Javex). Насамкінець, насіння промивали стерильною дистильованою водою 4 рази. Інокуляцію насіння проводили на середовищі КДА, що містить або не містить ендоефіти, в темряві та при кімнатній температурі [Abdellatif et al. 2009]. Мікроорганізми вирощували на КДА протягом щонайменше трьох днів в темряві та при кімнатній температурі, до використання в експерименті. Оцінку здатності ендоефітів до індукції формування стресостійкості проводили за допомогою вимірювання енергії проростання, яка служить для фіксації тимчасових рамок проростання та яка визначається як кількість днів, необхідних для досягнення проростання 50 % насіння.

Результати

50 Дане дослідження характеризує індивідуальні властивості грибних і бактеріальних ендоефітів до індукції формування у бобових посухо- та жаростійкості, специфічні до комбінації бактеріальний або грибний штам-сорт рослини-абіотичний стрес. Для кращого розуміння механізмів формування ендоефітами індукованої стресостійкості бобових, в даному дослідженні були використані методи протеомного та молекулярного аналізу.

55 Штами SMCD значно підвищили частоту проростання бобових *in vitro* в стандартних умовах (Фігура 33). У стресових умовах, обидва ендоефіта (SMCD 2206 і SMCD 2215) підвищили частоту проростання, в порівнянні з не колонізованим насінням. Частота проростання варіювала від 70-100 % в оброблених ендоефітами насінні, до 60-80 % у контролі, що означає: протестовані ендоефіти мають потенціал для збільшення енергії проростання насіння (SGV) на > 15 %. 60 Найбільша частота проростання (100 %) була виявлена у Glamis (сочевиці), яку викликали

обом ендofітами SMCD 2206 і SMCD 2215, при сильній посузі чи тепловому стресі. При спільній інокуляції штамами SMCD енергія проростання (проростання > 50 % насіння) у Glamis досягалася за 2 дні в умовах посухи і за 3 в умовах теплового стресу. Подібні результати були досягнуті і горохом Handel, якщо не враховувати того, що цей сорт сам по собі більш стійкий до теплового шоку, ніж Glamis (сочевиця).

Приклад 10

Ендofіти підвищували врожайність льону та ріпаку в умовах гострої посухи при експериментах в оранжереї.

Метою даного дослідження було застосування трьох випадково обраних ізолятів (SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2215) для перевірки ефективності їхнього впливу на формування врожаю льону та ріпаку в умовах посухи.

Матеріали та способи

План експерименту, процедури, яку проводили з насінням льону (Bethun і Sorel) та ріпаку (1768S), способи введення ендofітів (SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2215), умови посухи та способи оцінки врожайності відповідають продемонстрованим в Прикладі 5, з незначними змінами. Коротко, контрольні рослини поливали до досягнення значення вологості ґрунту до 100 %, три рази на тиждень, тоді як рослини, які піддавали посузі, поливали раз на тиждень до досягнення значення вологості ґрунту до 100 %. Такий режим посухи був встановлений для імітування природного циклу протікання посух, які можуть виникати під час періоду вегетації в канадських преріях, під час яких опади можуть не випадати протягом семи днів поспіль або навіть більше того.

Результати та їхнє обговорення

Сильна посуха призвела до зниження врожаю не симбіотичного льону, тоді як інокуляція ендofітів SMCD 2206 і SMCD 2210 призвела до сильного підвищення врожайності льону у таких же умовах. Зокрема, в умовах посухи, SMCD 2206 підтримував майже 100 % врожайності у Bethun, в той час як SMCD 2210 забезпечував 50 % врожайності, порівняно з контролем, який не зазнавав стресу, в умовах оранжереї (Фігура 34). У випадку з ріпаком підвищення врожайності було зафіксовано в комбінації з SMCD 2210 (> 100 %), за ним йдуть SMCD 2206 (~ 50 %) і SMCD 2215 (~ 30 %), у порівнянні з контролем, який не зазнав стресу (Фігура 35).

Здатність до захисту від *Fusarium avenaceum* і *F. graminearum* також була перевірена в умовах оранжереї. Насіння, що було автоклавоване, інфікували інокулятом *Fusaria* та інкубували в темряві протягом 7 днів при 25 °C (Фігура 36), після чого інокулювали ендofіти, вирощені в чашках Петрі, як описано в Abdellatif et al. [2009].

Ґрунтова суміш була інокульована двадцятьма насіннями, що містять *Fusarium*. Склад ґрунтової суміші: 55-65 % канадський сфагнум, торф, мох, перліт, і вапняк, змішаний з піском. Стандартні умови оранжереї включали 8-годинне освітлення, яке чергували з 16-годинним фотоперіодом (1000 люкс) при відносній вологості 70 % та постійній температурі 25 °C ± 2 °C.

Обробку рослин проводили у такий спосіб:

O1: Необроблені рослини (контроль)

O2: Рослина + ендofіт

O3: Рослина + патоген, *Fusarium avenaceum*

O4: Рослина + патоген, *Fusarium graminearum*

O5: Рослина + ендofітний гриб + *Fusarium avenaceum*

O6: Рослина + ендofіт + *Fusarium graminearum*.

Кожну обробку повторювали в вегетаційних посудинах, та проростки поливали тричі на тиждень у контрольованих умовах. Колонізацію коренів ендofітами перевіряли за допомогою флуоресцентного мікроскопа, для розмежування симбіотичних і патогенних відносин ендofіт-пшениця. [Abdellatif et al. 2009].

Фігури 37-40 ілюструють позитивний вплив ендofітів на протидію проростків наслідкам стресу (Фігура 37), формування біомаси листя та коренів (Фігура 38 і Фігура 39), фазу цвітіння та формування колосся (Фігура 38, Фігура 39 і Фігура 40). Всі протестовані ендofіти індукували ріст нормально сформованого листя, в порівнянні з контролем, так само як і ріст нормально сформованих квіток у присутності ендofітів.

Для підтвердження здатності ендofітів стимулювати ріст зрілих рослин в присутності патогенного гриба роду *Fusarium*, продуктивність стадії цвітіння, результатом якої було формування колосся, оцінювали на більш пізніх стадіях росту.

Гістограми на Фігурі 41 ілюструють продуктивність ендofітів у збільшенні біомаси, або сухої ваги, колосся пшениці після подвійної інокуляції (ендofітом SMCD та патогенним грибом роду *Fusarium*).

Врожайність пшениці в присутності ендofітів та патогенного грибу роду *Fusarium* була

значно підвищена застосуванням ендоефітів всіх штамів, у порівнянні з пшеницею, інфікованою *F. graminearum* і *F. avenaceum*, але не обробленою ендоефітами (Е-) (Фігура 41). Рослини, оброблені тільки патогеном, мали значно менший розмір колосся, в порівнянні з контрольними рослинами і рослинами, обробленими ендоефітами (Е+) (Фігура 42).

5 Приклад 11

Ендоефітно-опосередкована регуляція експресії генів стійкості до абіотичних стресів у бобових

РЕФЕРАТ

10 Геномні та білкові механізми позитивного впливу ендоефітів на стійкість рослин-хазяїв до абіотичних стресів вивчені недостатньо. Одна із сучасних теорій стверджує, що симбіотичні рослини захищаються від оксидативного стресу, викликаного такими стресовими чинниками, як підвищена температура, посуха та засоленість, продукцією антиоксидантних молекул. Мета даного дослідження – прояснення механізмів захисного симбіозу гороху, нуту та сочевиці шляхом оцінки експресії генів Pro, СОД, і MnСОД, що запускається взаємодією між хазяїном та ендоефітом. Результати даних досліджень показали наявність опосередкованої ендоефітами регуляції експресії генів у рослинах, інокульованих ендоефітами. Дані гени відіграють важливу роль та забезпечують захист хазяїна шляхом посилення стійкості до протестованих абіотичних факторів стресу.

Матеріали та способи

20 З метою проведення аналізу були зібрані листя шести сортів (Amit, Vanguard [нут] (Фігура 43), Golden, Handel [горох] і Glamis, Sedley [сочевиця]), які вирощені з нормального насіння та насіння, яке піддавали стресу, обробленого та необробленого ендоефітами.

Для ампліфікації генів, таких як гени проліну (Pro), СОД і MnСОД, застосовували ПЛР в реальному часі, з використанням праймерів з послідовностями, зазначеними в SEQ ID NO: 8-15 (Таблиця 6), при цьому стресові білки, як правило, відіграють особливу роль у захисті цитоплазми від зневоднення і в захисті рослин шляхом зниження токсичності, викликаній високою концентрацією іонів. ПЛР проводили за наступних умов: 3 хвилини при 95 °C (активація ферменту), 40 циклів по 30 секунд при 95 °C (денатурація) і 30 секунд при 60 °C (відпал/подовження). Насамкінець, аналіз кривої плавлення проводили в діапазоні температур від 65° до 95 °C з кроком в 0,5 °C, кожен крок тривав 5 секунд, щоб переконатися в наявності єдиного продукту і відсутності димерів праймерів. Кількісний аналіз щодо контрольного гену проводили шляхом віднімання СТ контрольного гена від СТ таргетного гена (ΔСТ). Для визначення відносних рівнів експресії, отриману різницю числа циклів ділили на значення калібратора нормалізованого значення таргетного гена, отримане значення (ΔΔСТ) є експонентом з основою 2 (через подвоєння функції ПЛР).

Результати

Було проаналізовано експресію різних генів під час впливу посухи. Таблиця 6 відображає гени, які піддалися аналізу. Деякі з отриманих результатів відносяться до представників сорту Handel, які зазнали впливу 6 % ПЕГ.

40 СОД і MnСОД

В цілому, СОД відіграє основну роль у здійсненні антиоксидантних захисних механізмів. У даному дослідженні був виявлений дуже високий рівень експресії СОД в нормальних (Е-, контроль) листках, які зазнали впливу 6 % ПЕГ (майже 200-кратне підвищення експресії). Ендоефіти відігравали дуже важливу роль у зменшенні цього стресу. Особливо SMCD 2215, за ним ішли SMCD 2210, SMCD 2204 і SMCD 2206. Ці симбіонти різко знижували стрес шляхом зниження експресії всього лише в 9 і 24 рази (Фігура 44А).

MnСОД – це одна з форм СОД. У контрольних листках спостерігали 16-кратне збільшення експресії генів, тоді як SMCD 2215 придушував стрес та знижував зміну рівня експресії з 16-кратного до 2-кратного, за ним ішли SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2204 (Фігура 44В).

50 Пролін

Пролін є важливим для первинного метаболізму. Біосинтез проліну у рослин контролюється активністю двох генів P5CS. Експресію цього гену оцінювали у сорті гороху Handel, який був колонізований ендоефітами та перебував в умовах посухи. Як і передбачали, ген P5CS активувався, і його експресія збільшилася в 5 разів на листках, отриманих з рослин, які піддавали впливу ПЕГ. У той же час в листках, зібраних з рослин, насіння яких були асоційовано з SMCD 2206, експресія збільшувалася в 2,8 рази, за ним слідував SMCD 2215 з 3,4-кратним підвищенням експресії генів, що кодують пролін (Фігура 45). Дані результати підтвердили, що ендоефіти відіграють значну роль у забезпеченні стресостійкості шляхом зміни експресії генів проліну, у порівнянні з рослинами, що зазнали стресу та були не інокульованими.

60 Приклад 12

Патерни експресії генів в колеоризі пшениці в умовах холодової та біологічної стратифікації

Реферат

Пшениця являє собою одну з основних широко використовуваних сільськогосподарських культур у світі. Однак за останні два десятиліття всесвітня продукція пшениці зменшилася на 5,5 %, і передбачається подальше зменшення, у зв'язку з глобальним потеплінням. Таким чином, пошук умов і методів, які могли б збільшити схожість насіння, є дуже важливим. Холодова стратифікація є широко відомим способом виведення насіння зі стану спокою та стимуляції їхнього проростання. Біологічна стратифікація грибними ендосфітами також може стимулювати проростання насіння багатьох зернових культур. колеориза являє собою одну з найбільш активних тканин насіння, а також – частину насіння, яка першою виходить назовні при проростанні. Для оцінки ефективності способів стратифікації був визначений відсоток схожості насіння пшениці, яке зазнало холодової та біологічної стратифікації, а також було визначено рівень експресії генів гібереліну (ГК) і абсцизової кислоти (АБК) в колеоризі. Як холодова, так і біологічна стратифікація значно ($P < 0,05$) підвищують рівень та ефективність проростання. Відстань між грибним ендосфітами та насінням являє собою визначальний для біологічної стратифікації фактор, оскільки насіння, яке перебуває у безпосередньому контакті з грибним ендосфітом, має найвищий відсоток проростання (до 86 %). Підвищена експресія гену GA3ox2 в колеоризі пшениці була виявлена протягом періоду проростання шляхом виявлення стійкої продукції біоактивної молекули GA3. Експресія гену 14-3-3 була найнижчою після прямої обробки ендосфітами. Експресія гену біосинтезу абсцизової кислоти (АБК), TaNCED2, була значно вищою в насінні, яке було в умовах холодової стратифікації, що відображає роль АБК як гормону стресової адаптації. У колеоризі також було виявлено підвищення експресії гену TaABA8'OH1. В цілому, дане дослідження дає молекулярно-біологічні докази важливості колеоризи для проростання насіння пшениці. Порівнюючи холододовий та біологічний способи стратифікації, можна зробити висновок, що схожість насіння може бути помітно підвищена шляхом застосування грибних ендосфітів, і що відстань між зерном та ендосфітом являє собою ключовий для міковітальності фактор.

Матеріали та способи

Насіння пшениці

У даному дослідженні застосовували насіння твердої пшениці сорту AC Avonlea, що має низьку стійкість до стресових умов навколишнього середовища. Ці насіння були вироблені Agriculture and Agri-Food Canada Seed Increase Unit Research Farm в 2006 році в умовах оранжереї, і були рекомендоване як те, що не містить мікроорганізмів. Насіння поміщали в стерильні пакети із застібкою та зберігали при 4°C до подальшого застосування.

Порівняння протоколів стерилізації насіння

Для стерилізації поверхні насіння пшениці були запропоновані різні способи. У даному документі чотири широко визнаних способи стерилізації насіння порівнювали між собою для визначення оптимального протоколу, за допомогою якого можна було б ефективно стерилізувати поверхню насіння, не погіршуючи якість та життєздатність насіння пшениці цього сорту. У першому способі, поверхню насіння стерилізували 95 % етанолом протягом 10 с, з подальшим триразовим, по 1 хв промиванням стерильною дистильованою водою [Zhang et al., 2007. BMC Genetics 8]. Другий протокол використовував для стерилізації відбілювач: поверхню насіння стерилізували в 5 % розчині натрій гіпохлориту протягом 3 хв з подальшим ретельним триразовим по 1 хв обполіскуванням насіння стерильною дистильованою водою. Відповідно до третього протоколу, поверхню насіння стерилізували 95 % етанолом протягом 10 с, насіння промивали стерильною дистильованою водою, а потім занурювали на 3 хв у 5 % розчин натрій гіпохлориту, промивали три рази в стерильній дистильованій воді та поміщали на картопляно-декстрозний агар (КДА) для забезпечення їхнього проростання [Abdellatif et al. 2009]. Четвертий спосіб використовував для стерилізації насіння пари хлору (газоподібного) [Desfeux et al., 2000]. Під витяжною шафою невеликий стакан, що містить 20 мл відбілювача, поміщали в 5-літрову коробку з газовідвідними конекторами. Насіння пшениці поміщали в 96-ямковий планшет і утримували його в коробці з газовідвідними конекторами. Потім, для створення газоподібного хлору, в стакан з відбілювачем додавали 3 мл концентрованої соляної кислоти. Для утримання насіння в контакті з газоподібним хлором, кришку не відкривали протягом 4 годин. Після стерилізації, 96-ямковий планшет поміщали в ламінарний бокс на 1 годину, для розсіювання залишків газоподібного хлору. Потім стерилізоване насіння тричі промивали стерильною дистильованою водою і висівали на чашки з КДА. Порівняння цих способів стерилізації показало, що стерилізація газоподібним хлором є найефективнішим способом, що забезпечує 80 % схожість насіння без контамінації, при тому, що контрольні насіння мали вищий рівень контамінації (Таблиця 7). І хоча способи стерилізації етанолом і відбілювачем успішно

знижували контамінацію, при цьому вони сильно впливали на схожість насіння. Таким чином, протокол стерилізації газоподібним хлором являє собою досить ефективний спосіб стерилізації насіння пшениці, і саме він був обраний для стерилізації насіння, необхідної для здійснення експериментів, проведених в даному дослідженні.

5 Холодова та біологічна стратифікація

Для проведення холодової стратифікації, поверхнево стерилізовані насіння утримували на вологому фільтрувальному папері в холодильній кімнаті при 4°C протягом 48 годин [Mukhopadhyay et al., 2004; Wu et al., 2008]. Через 2 дні насіння, що пройшло холодову стратифікацію, переміщали в умови кімнатної температури і швидко промивали стерильною дистильованою водою, після чого поміщали на чашки з картопляно-декстрозним агаром (КДА). Для проведення біологічної стратифікації, стерилізоване насіння інкубували в присутності SMCD 2206. Грибний ендосфит вирощували на КДА в темряві при кімнатній температурі протягом щонайменше трьох днів до застосування. Для оцінки ефективності стратифікації, насіння пшениці пророщували в безпосередньому контакті з грибним ендосфитами, а також на деякій відстані від нього. (5 мм²) агарової пластинки з ендосфитами, відокремлену від країв материнської колонії, поміщали в центр 90 см чашки Петрі з КДА. Потім 10 поверхнево стерилізованих насінин поміщали на периферії чашки Петрі, на відстані близько 4 см, оточуючи таким чином агарову пластинку з грибами. Всі чашки Петрі запечатувалися 5 шарами плівки Parafilm® (Pechiny Plastic Packaging), щоб уникнути біологічної контамінації та поширення летючих газоподібних сполук. Вплив прямого контакту грибного ендосфита визначали шляхом розміщення 3 мм² агарової пластинки між двома сусідніми поверхнево стерилізованими насінинами та 5 мм² пластинки до центра КДА. Всі процедури були виконані в трьох повтореннях на чашках з КДА в кожену чашку Петрі поміщали десять поверхнево стерилізованих насінин. Чашки Петрі інкубували в настільному інкубаторі при кімнатній температурі (~ 20°C) в темряві. Час інкубації записували та додавали в базу даних, ізоляцію колеоризи проводили через 24, 48 і 72 години.

Відсоток схожості

Появу ранніх первинних коренів ретельно відстежували. Відсоток схожості розраховували шляхом оцінки кількості пророслого насіння на 10 насінин пшениці на кожній чашці з КДА. Схожість в 50 % оцінювали як енергію проростання. Ефективність проростання при різних способах обробки оцінювали за допомогою наступного рівняння:

Ефективність = % проростання при обробці – % проростання в контролі [Рівняння 1]

Рівні схожості спостерігали для всіх оброблених зразків і на всіх повтореннях. Для оцінки загальної життєздатності зразків на день 2 і день 3 рівні схожості контролювали, починаючи з дня 1. Чашки із КДА зберігали запечатаними протягом усього періоду збору даних.

Виділення колеоризи

Після оцінки рівнів проростання, чашки з КДА негайно переносили в стерильний ламінарний бокс для ізоляції колеоризи. Насіння пшениці акуратно розчленовували під мікроскопом, шари колеоризи відокремлювали за допомогою стерильної голки і скальпеля. Виділену колеоризу зберігали в очищених від РНКаз стерильних мікроцентрифужних пробірках. Насіння, отримані в результаті усіх біологічних повторювань були об'єднані, і для отримання оптимальної для екстракції РНК кількості рослинного матеріалу було виділено близько 20–30 колеориз.

Екстракція РНК і синтез ДНК

Щоб уникнути деградації рослинного матеріалу, виділення РНК проводили щодня, відразу після виділення колеоризи. Для виділення РНК використали близько 20 мг зразків колеоризи. Виділення загальної РНК проводили за допомогою Aurum™ Total RNA Mini Kits, згідно з інструкціями виробника (Bio-Rad Laboratories). Концентрацію РНК вимірювали спектрофотометричним методом на Nanodrop (Thermo Scientific). Синтез кДНК проводили відразу після виділення РНК за допомогою iScript cDNA Synthesis Kit, відповідно до інструкції від виробника (Bio-Rad Laboratories). Для синтезу кДНК брали 600 нг аліквоти РНК. Зворотну транскрипцію проводили протягом 30 хвилин при 42 °C, з кінцевою денатурацією протягом 5 хвилин при 85 °C.

Кількісний ПЛР у реальному часі

Експресію функціональних генів гібереліну та абсцизової кислоти вимірювали за допомогою відносного кількісного ПЛР у реальному часі (QRT-PCR). Різні катаболічні біосинтетичні гени були відібрані для оцінки їхньої відповідної ролі в холодівій та біологічній стратифікації. Фрагмент гену актину пшениці завдовжки 131 п.н використовували в якості внутрішнього контролю [Nakamura et al., 2010]. QRT-PCR проводили за допомогою термоциклеру MJ-Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories), відповідно до інструкції від виробника. Умови проведення ПЛР: 1 цикл при 95 °C протягом 1 хвилини і 40 циклів по 20 секунд при 94 °C, 60 °C

протягом 30 секунд, і 72 °C протягом 1 хвилини. Для ПЛР в реальному часі застосовували отримані зразки кДНК, всі реакції проводили в трьох повтореннях, з двома негативними контролюми. Кожні 25 мкл реакційної суміші містили 18 мкл iQTM SYBR[®] Green supermix (Bio-Rad Laboratories), 10 пмоль відповідних прямих і зворотних праймерів, 2,5 мкл бичого сироваткового альбуміну і 25 нг зразків кДНК. Кількісний аналіз виконували згідно Zhang et al. [2007]. Рівні експресії були розраховані з використанням значення порогового циклу (Ct), визначеного згідно встановленої вручну базової лінії. Різницю між значеннями Ct гену-мішені та актину ($Ct^{\text{target}} - Ct^{\text{actin}}$) оцінювали як ΔCt , після чого рівень експресії розраховували як $2^{-\Delta Ct}$. Середні значення $2^{-\Delta Ct}$ були використані для оцінки різниці рівнів експресії у контролі та зразках, що зазнали стратифікації. Для перевірки наявності ампліфіконів та специфічності їхніх послідовностей, аналіз кривих плавлення і електрофорез в агарозному гелі проводили після проходження кожної QRT-PCR.

Секвенування

Амплікони актину та різних генів GA і ABA очищали за допомогою Bio Basic PCR Purification Kit (Bio Basic Inc.). Для кожної обробки, очищені амплікони були відправлені для секвенування в Plant Biotechnology Institute (NRC-PBI). Послідовності генів були визначені шляхом проведення аналізу Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>].

Аналіз статистичних даних

Однофакторний дисперсійний аналіз даних, який стосується відсотка схожості і експресії генів, проводили за допомогою програмного забезпечення IBM SPSS Statistics, версія 19. Відмінності між контрольною групою та групою, яку піддали стратифікації, оцінювали за допомогою post-hoc тесту Дункана.

Результати та їхнє обговорення

Відсоток схожості і ефективність проростання

Як холодова, так і біологічна стратифікація значно підвищили рівень схожості при всіх трьох типах обробки, демонструючи більш високий відсоток схожості, ніж в контрольному варіанті (Фігура 46A; Таблиця 8). Після прямої обробки ендосфітами щодня спостерігали збільшення відсотка схожості, а також його збільшення на 60 % у період з дня 1 по день 3. Протягом усього періоду проростання (3 дні) у них була відзначена значно ($P < 0,05$) більш висока схожість, ніж при трьох інших типах обробки. Тільки біологічна стратифікація призвела до більш ніж 50 % схожості після 2 дня. Цікаво зазначити, що непряма обробка ендосфітами не призвела до проростання після першого дня, але викликала примітну 50 % схожість після другого дня. Вплив холодової стратифікації не призвів до появи істотних відмінностей від контролю після першого дня, але потім поступово збільшував їх, продемонструвавши появу значних відмінностей після другого та третього днів. Патерн збільшення проростання також відображається значеннями R^2 . У той час, як у контролі значення R^2 відповідало 0,40, в умовах холодової стратифікації і прямої обробки ендосфітами воно дорівнювало 0,60 і 0,75, відповідно. З іншого боку, за причиною 50 % росту з першого по другий день, непряма обробка ендосфітами продемонструвала найвище значення R^2 , рівне 0,93, що в близько 2,5 рази вище, ніж у контролі. Енергія проростання являє собою критичний параметр, що визначає здатність насіння до переривання стану спокою і старту проростання. Енергія проростання розраховується як відсоток схожості насіння через певний період часу, або як кількість днів, необхідних для досягнення 50 % схожості. Пряма стратифікація ендосфітами показала найвищу ефективність, за нею слідували непряма і холодова стратифікація (Фігура 46B). Так як при непрямій обробці ендосфітами не спостерігали проростання насіння після першого дня, ефективність проростання була негативною. В цілому, стратифікація показала надзвичайно позитивний результат, призвівши до досягнення 50 % схожості за 48 годин.

Стратифікація відіграє важливу екологічну роль при виході зі стану первинного спокою та у підвищенні схожості насіння [Bewley, Black 1982; Probert et al., 1989]. Ослаблення стану спокою насіння та покращення схожості шляхом холодової стратифікації були досягнуті у багатьох видів, включаючи злакові [Schutz і Rave 1999], шовковицю [Koyuncu 2005], сосну [Carpita et al., 1983], тютюн [Wu et al., 2008], рис [Mukhopadhyay et al. 2004] та яблуню [Bogatek і Lewak 1988]. За допомогою холодової стратифікації також була збільшена схожість 33 видів однорічних бур'янів і було припущено, що стратифікація здатна звести до нуля відмінності між схожістю насіння у різних популяцій [Milberg і Andersson 1998]. Проте є мало інформації про вплив холодової стратифікації на проростання насіння пшениці. Дане дослідження показало, що для реалізації ефекту холодової стратифікації необхідний період ініціації і, тому, схожість насіння істотно не відрізнялася від контролю в перший день. Тим не менш, вона продемонструвала значний вплив на проростання, починаючи з другого дня, та збільшила відсоток схожості на цілих 20 %, у порівнянні з контролем. При підборі тривалості холодової стратифікації в даному

дослідженні керувалися даними попередніх звітів, які показали, що період в 48 годин ефективний для холодової стратифікації тютюну [Wu et al., 2008] і рису [Mukhopadhyay et al. 2004]. Більш ранні дослідження показали, що ефект від холодової стратифікації пропорційно залежить від тривалості її впливу [Baskin et al. 1992; Cavieres i Arroyo, 2000]. Отримані нами дані підтверджують це, і дозволяють передбачити, що для досягнення максимальної схожості пшениці може знадобитися трохи більший період стратифікації (~ 4 днів).

У декількох звітах говориться про підвищення схожості насіння в результаті застосування грибових ендofітів [Vujanovic 2007b; Hubbard et al. 2012; Vujanovic and Vujanovic 2007]. Це дослідження підтримує концепцію "міковіталізму", суттю якого є збільшення життєвої сили шляхом грибний колонізації. Широко відомим є властивість грибних ендofітів виробляти летучі сполуки, які впливають на тривалість рослинних фенофаз [Mitchell et al., 2009; Strobel et al., 2004]. Таким чином, ендofіти можуть впливати на проростання насіння, навіть якщо вони не перебувають у прямому контакті з насінням, і ця риса являє собою особливо цінною у польових умовах. У даному дослідженні також перевіряється те, як фізична відстань при біологічній стратифікації може впливати на схожість. Отримані результати показують, що насіння, яке знаходиться в безпосередньому контакті з грибним ендofітом, отримувало безсумнівно більше вигоди, ніж її аналоги. Прямий контакт з ендofітами був причиною найбільш високого відсотка схожості та ефективності проростання в кожен день періоду проростання. Подібно прямому контакту з ендofітами, насіння, яке перебувало в 4 см від ендofіта, також мали значно вищий рівень схожості, ніж контроль. Проте, відстань дійсно вплинула на відсоток схожості та ефективність проростання, і що у насіння, яке не перебувало в прямому контакті, значення відсотка схожості було на 14-27 % менше, ніж у насіння, яке перебувало в прямому контакті. Крім того, проростання не спостерігали у перший день, за чим був різкий ріст його показників (50 %) на другий день. Схожість насіння являє собою надзвичайно складний процес та лежать в основі цього явища слабо вивчені механізми [Nonogaki et al., 2010]. Так, не ясно, яким чином грибні ендofіти полегшують вихід насіння із стану спокою та запускають проростання насіння. Враховуючи здатність грибів виробляти широкий спектр речовин, що підсилюють ріст рослин, є можливим, що ці речовини діють більш ефективно при безпосередній близькості. Отже, насіння, що пройшли пряму обробку ендofітами, мають значно більш високу схожість, ніж при інших способах обробки. Навпаки, насіння, що минули непряму обробку ендofітами, демонстрували високу ефективність проростання через 48 годин, цей період повинен був дозволити їм накопичити достатню кількість речовин, що стимулюють ріст. Існує різниця (6,6 %) між значеннями відсотка схожості у контрольних групах та групах, які пройшли непряму обробку ендofітами, проте вона не істотна.

Рівні експресії генів гібереліну та абсцизової кислоти

Гени GA3-оксидази 2 і 14-3-3 були обрані як гени біосинтезу ГК та як негативний регулятор сигнального шляху біосинтезу ЦК, відповідно [Ji et al., 2011; Zhang et al., 2007]. Ген NCED є широко відомим через виконання ним важливої ролі в сигнальних шляхах біосинтезу АБК, у той час як ген АБК 8'-гідроксилази бере участь у катаболічних сигнальних шляхах [Ji et al., 2011]. Аналіз кількісного ПЛР в реальному часі показав, що значення диференціальної експресії (Фігура 47) та співвідношення рівнів експресії (Фігура 48) різних функціональних генів значно розрізнялися ($P < 0,05$) при різних способах обробки. Достатні для детекції рівні експресії всіх генів, за винятком гену 14-3-3 в третій день, виявлялися щодня. Рівні експресії всіх генів в перший день знизилися, у порівнянні з контролем. Експресія гену біосинтезу ГК, TaGA3ox2, в умовах холодової стратифікації була значно вище, ніж при біологічній стратифікації. З іншого боку, не було виявлено значущих відмінностей між рівнями експресії гену 14-3-3 при обробці холодом та ендofітами, хоча рівень його експресії в умовах холодової стратифікації був трохи вище, ніж при ендofітній стратифікації. Рівні транскрипції TaNCED2, гену біосинтезу АБК, не відрізнялися у контрольній групі та групі, в якій проводили холодову стратифікацію, але значно підвищувалися при обробці насіння ендofітами. При всіх трьох способах стратифікації виявлялося зниження експресії гену АБК 8'-гідроксидази, TaABA8'OH1, при цьому найнижчий рівень експресії спостерігали в умовах холодової стратифікації. Патерни експресії при прямій і непрямій обробці ендofітами не відрізнялися. На другий день експресія TaGA3ox2 була значно знижена в порівнянні з контролем, при всіх типах стратифікації. В умовах холодової стратифікації і непрямій обробці ендofітами експресія не відрізнялася, найнижчий рівень експресії був зафіксований в колеоризах, які піддавалися прямій обробці ендofітами. Значущих відмінностей між рівнями транскрипції 14-3-3 при всіх чотирьох типах обробки виявлено не було, хоча під впливом холодової стратифікації експресія була трохи вище. Експресія генів TaNCED2 при обробці ендofітами була значно нижчою, ніж під впливом холодової стратифікації або у контролі. Аналогічним чином, при стратифікації було виявлено значне

зниження експресії гену TaABA8'OH1, в порівнянні з контролем. Найбільш низький рівень експресії був зафіксований при непрямій обробці ендofітами. Рівні експресії гену TaGA3ox2 при різних типах обробки також значимо відрізнялися на третій день. Під впливом холодової стратифікації його експресія була приблизно в десять разів вище, ніж у контролі, тоді як при обробці ендofітами обома способами вона значуще не відрізнялася. Навпаки, експресія генів TaNCED2 і TaABA8'OH1 знизилася при стратифікації всіх типів, з найбільш низькими рівнями експресії при прямій і непрямій обробці ендofітами, відповідно. Експресію гену 14-3-3 на третій день не спостерігали.

Співвідношення рівнів експресії генів біосинтезу ГК та АБК, TaGA3ox2: TaNCED2, при різних типах обробки значимо не відрізнялися в перший день, але пізніше вони неухильно зростали (Фігура 48). На другий день після непрямой обробки ендofітами було виявлено найвище його значення, яке було вище, ніж при інших типах обробки в близько 5-10 разів; однак значення цього параметра на третій день були рівні при всіх типах обробки. Навпаки, співвідношення експресії генів біосинтезу ГК та катаболічних генів (TaGA3ox2: 14-3-3) у перший день було найвищим при прямій обробці ендofітами, за нею слідувала непряма обробка, холодова стратифікація та контроль, що дуже схоже на тенденцію з відсотком їхньої схожості. На перший день при всіх типах обробки виявлялися подібні патерни співвідношення експресії генів біосинтезу ГК та генів катаболізму АБК, TaGA3ox2: TaABA1, але, тим не менш, на другий день, при непрямій обробці ендofітами, воно було значно вище, ніж при інших типах обробки. На перший день, під впливом холодової стратифікації та непрямой стратифікації ендofітами виявляли однакові рівні їхньої експресії, а в контролі вона була незначною. Значення співвідношення між генами біосинтезу АБК і генами її катаболізму (TaNCED2: TaABA1) при різних типах обробки не відрізнялося протягом усього періоду проростання, хоча холодова стратифікація привела до підвищення рівня стратифікації в перший день.

Гени, що кодують ферменти біосинтезу і катаболізму ГК і АБК, мали різні патерни, залежно від накопичення транскриптів [Hedden and Phillips, 2000]. Патерни експресії генів GA3ox1 були вивчені у багатьох видів рослин, включаючи арабідопсис [Phillips et al., 1995], рис [Oikawa et al., 2004] і пшеницю [Zhang et al., 2007]. У той час як інші гени біосинтезу ГК, такі як GA-20ox, пов'язують із ростом вегетативних тканин та квітів, GA3ox (GA3ox2 або GA4H) експресуються виключно в насінні при їхньому проростанні і, вірогідно, відіграють у цьому ключову роль [Phillips et al., 1995; Yamaguchi et al., 1998; Hedden, Phillips, 2000]. Подібно попереднім звітам, це дослідження також продемонструвало високий рівень експресії гену GA3ox2 в колеоризі пшениці під час її проростання. Потенційно, не обмежуючись рамками теорії, це говорить про стабільний синтез біологічно активної форми ГК – молекули GA3, в колеоризі пшениці при проростанні. З іншого боку, в колеоризі також була виявлена низька експресія гену 14-3-3, негативного регулятора біосинтезу ГК. З поступовим виростанням проростків і збільшенням вмісту ендogenousної ГК, рівень транскрипції 14-3-3 теж зменшувався, до остаточного його зниження на другий день. Цікаво, що в контролі спостерігали найвищий рівень 14-3-3, за ним слідували холодова стратифікація, пряма та непряма обробка ендofітами, що відобразилося на їхньому проростанні. Ці результати відповідають попереднім звітам Zhang et al. [2007], які показали, що гени біосинтезу ГК та катаболічні гени тісно пов'язані з вмістом ГК та росту пагонів.

Система експресії генів шляху АБК була досліджена в широкому спектрі представників злаків і бобових, таких як рис [Oliver et al., 2007], пшениця [Ji et al., 2011; Nakamura et al., 2010], боб [Qin, Zeevart, 1999]. Поточні результати вказують на те, що експресія гену TaNCED2 не сильно розрізнялася між групами, які підверглися різним способам обробки, за винятком груп контролю та холодової стратифікації в перший день. Абсцизова кислота відіграє ключову роль в сигнальних шляхах адаптації рослин до стресу [Nakamura et al., 2010]. Оскільки насіння, яке зазнало холодову стратифікацію, перебувало при 4 °C протягом 48 годин до їхньої інкубації при кімнатній температурі, зміст абсцизової кислоти, можливо, був вище. З іншого боку, підвищена експресія TaNCED2 в контролі могла призвести до підвищення синтезу АБК і, таким чином, до уповільнення рівня схожості. Останні роботи підтверджують, що катаболізм АБК відбувається, переважно, в колеоризі [Millar et al., 2006; Okamoto et al., 2006]. Більше того, Barrero et al. [2009] повідомили про активацію та найвищої експресії ABA8'OH-1 в колеоризі ячменю. Подібно цим даним, в даному дослідженні високий рівень експресії гена TaABA8'OH1 був відзначений в колеоризі пшениці. Значення співвідношення рівнів генів біосинтезу ГК та АБК тісно пов'язане з відсотком схожості. Незважаючи на те, що значення TaGA3ox2: TaNCED2 значно не відрізнялося після першого дня, при непрямій обробці ендofітами воно було найвищим на другий день, через його значне збільшення. З іншого боку, всі три типи стратифікації привели до значного збільшення TaGA3ox2: TaNCED2 на третій день, що відобразилося на їхній схожості.

Механізми, що лежать в основі біологічної стратифікації, все ще відносно невідомі, але вони могли б допомогти зрозуміти, як відбуваються взаємодії між рослиною та грибом на ранніх стадіях проростання. Роль грибних ендоситів, як біостимуляторів, є загально визнаною [Arnold et al., 2001; Hubbard et al. 2011; Saikkonen et al., 1998; Khan et al. 2012]. У даному дослідженні ми продемонстрували, що грибні ендосити можуть значно стимулювати проростання насіння, та сила такої міковітальності пропорційна відстані між насінням і грибним ендоситом. Більш того, ефект від опосередкованої грибними ендоситами біологічної стратифікації значно більш виражений, ніж від попередньої обробки холодом. Попередні дослідження показали, що ступінь ініціації проростання пропорційна тривалості холодової стратифікації [Cavieres, Arroyo, 2000], враховуючи це, в наступних дослідженнях період холодової стратифікації може бути продовжений (> 48 годин), для збільшення схожості насіння пшениці. Незважаючи на те, що холодова стратифікація збільшує рівень транскрипції генів біосинтезу АБК, грибні ендосити не стимулюють безпосередньо експресію генів регуляторів росту в колеоризі. Однак, ці дослідження приділили особливу увагу визначенню експресії чотирьох генів у колеоризі.

Жодне з досліджень не порівнювало ступеня схожості після холодової та біологічної стратифікації і не проводило оцінку експресії генів біосинтезу та катаболізму ЦК та АБК в колеоризі пшениці. Раніше колеориза була представлена як високоактивний компонент проростання насіння [Barrero et al., 2009]. Відповідно до цього прикладу, в колеоризі проростаючого насіння пшениці було також продемонстрована висока експресія різних функціональних генів. Проростання насіння в значній мірі може бути посилено шляхом застосування грибних ендоситів: 1) шляхом непрямої міковітальності, або при відсутності контакту між насінням та ендоситами на протестованій відстані (наприклад, в цьому прикладі використовувалося відстань рівне 4 см) і 2) шляхом прямої міковітальності, або у випадку досягнення ендоситами зерна.

Приклад 13

Стратифікація ендоситами впливає на гормональні регулятори (RSG і KAO) та гени резистентності MYB

Стратифікація являє собою вплив на насіння холодowymi та вологими умовами, з метою переривання стану спокою та посилення схожості. Так як в даний час стратифікація обмежена застосуванням в цій ролі абіотичних факторів, дане дослідження спрямоване на досягнення більш широкого визнання ролі біотичних факторів з використанням міковітальності або моделі симбіозу насіння-гриб. Це підтверджує існування як холодової, так і біологічної стратифікації. Схожість насіння пшениці, схильних до холодової стратифікації при 4 °C, порівнювали зі схожістю насіння, яке було інокульовано при кімнатній температурі. Насіння було інокульовано ендоситами штаму SMCD 2206. Здійснювали оцінку змін у патернах експресії генів-регуляторів стимуляції росту насіння (RSG і KAO), фітогормональних гіберелінах (ГК); та набутих генів стійкості (MYB) в умовах абіотичного та біотичного впливу на ранніх етапах переривання періоду спокою та проростання. Вимірювання в клітинах колеоризи проводили за допомогою qRT-PCR (як це було описано в Прикладі 12). Отримані результати показали, що експресія генів RSG і KAO (Фігура 49), які кодуєть ферменти біосинтезу ГК, та генів резистентності MYB (Фігура 49) збільшується в інокульованому насінні. Таким чином, міковітальність викликає ефект перепрограмування процесів, що відбуваються в насінні пшениці до та після його проростання, приводячи до прискорення переривання періоду спокою та збільшенню схожості, ефективно сприяючи пренатальному догляду за насінням злакових культур.

Матеріали та способи

Зразки РНК

Дане дослідження являє собою продовження Прикладу 12. Ті ж матеріали (пшениця SMCD 2206) і способи *in vitro*, а також виділені проби РНК застосовували для оцінки експресії генів-регуляторів фітогормонів RSG і KAO і генів резистентності MYB за допомогою qRT-PCR.

До екстракції РНК пробірки, які містять тканини колеоризи зберігали в рідкому азоті, в який вони поміщали відразу після виділення тканин колеоризи, для збереження клітин та запобігання денатурації РНК. Для екстракції загальної РНК з рослинних клітин застосовували AurumTM Total RNA Mini Kit (Bio-Rad Laboratories), що має на увазі, що для кожної проби було необхідно не менше ніж 20 мг рослинних тканин. Всі етапи екстракції проводили дуже швидко, і протягом всього процесу проби знаходилися на льоду, так як РНК_с дуже швидко денатурує при кімнатній температурі. Свіжу виділену загальну РНК_с безпосередньо завантажували у пробірки з попередньо змішаними реагентами для синтезу РНК, отриманими з iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories). Зворотну транскрипцію проводили в термоциклері протягом 30 хвилин при 42 °C, із кінцевою денатурацією при 85 °C протягом 5 хвилин. Концентрацію ДНК вимірювали за допомогою Nanodrop (Thermo Scientific), та доводили до 100 нг/мкл.

Кількісний RT-PCR та аналіз статистичних даних

Кількісний ПЛР у реальному часі (QRT-PCR) проводили за допомогою MiniOpticon™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) із застосуванням iQ™ SYBR® Green supermix kit (Bio-Rad Laboratories). Для нормалізації даних QRT-PCR ген актину (фрагмент довжиною 131 п.н.) був обраний в якості контрольного гену та виконував функцію внутрішнього контролю, для запобігання отримання помилкової оцінки експресії генів при низькій концентрації кДНК [Zhang et al. 2007; Nicot 2005]. Праймери генів KAO і RSG, взяті з Zhang et al. [2007], які тестували в даному експерименті, в той час як оригінальні праймери створювали для MYB1 і MYB2, виходячи із загальнодоступних послідовностей *Triticum aestivum* (http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/geneprod_search.pl) в лабораторії комп'ютерної біології та функціональної геноміки (Гарвардський університет). По-новому спроектовані праймери MYB (Таблиця 9):

мРНК транскрипційного фактора Myb2 (158 п.н), що містить послідовності, які представлені в SEQ ID NO: 16 і SEQ ID NO: 17 та мРНК транскрипційного фактора Myb1 (152 п.н), що містить послідовності, представлені в SEQ ID NO: 18 і SEQ ID NO: 19 (Таблиця 9).

100 нг / мкл проби кДНК повторно розбавляли до 10 нг / мкл, для кожної 25 мкл реакційної проби використовували по 2 мкл розчину кДНК. Крім того, для отримання 25 мкл реакційної суміші використовували 12,5 мкл розчину iQ™ SYBR® Green supermix, 8,5 мкл стерильної milli-Q води, і по 1 мкл кожного прямого і зворотного праймера (10 пмоль). Протокол роботи термоциклеру: 10 хвилин при 95 °C, 40 циклів по 20 секунд при 94 °C, 30 секунд при 60 °C і 72 °C протягом 1 хвилини. QRT-PCR виконували в трьох повтореннях для всіх зразків кДНК, отриманих при всіх типах обробки, з двома негативними контролюми в кожній реакції. Рівні експресії генів відсилали до кількісних кривих, побудованими за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ Software (Bio-Rad Laboratories). Кількісне значення циклу (Cq) із записаних вимірювань рівня флуоресценції встановлювали вручну, виходячи з базової лінії. У даному дослідженні застосовували статистичний спосіб відносного кількісного визначення [Gizinger 2002]. Співвідношення значення даного цільового гену до значення гену ендогенного контролю використовували для порівняння проб, які зазнали різних типам обробки. Кількісний аналіз (ΔCT) проводили шляхом віднімання із значення Cq цільового гену значення Cq контрольного гену. Далі від ΔCT віднімалися значення калібратора з отриманням відповідних значень ΔΔCT, які були перетворені в log2 (функція двійкового логарифму ПЛР) для отримання відносних рівнів експресії генів [Jurado et al., 2010]. Продукти ампліфікації генів RSG, KAO і MYB очищували за допомогою Bio Basic PCR Purification Kit (Bio Basic Inc.) і відсилали для секвенування в Plant Biotechnology Institute (NRC-PBI). Послідовності генів були визначені шляхом проведення аналізу Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Послідовності високо ідентичних або схожих генів відповідають різним гомологічним організмам збирали та вирівнювали за допомогою програми MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Філогенетичне дерево було створено за допомогою статистичного способу приєднання сусідів на основі вирівняних генів.

Приклад 14

Була показана регулююча дія оксиду азоту (NO) на міковіталізм на ранніх стадіях проростання насіння.

Оксид азоту (NO) являє собою дуже реактивну сигнальну молекулу, загальну для грибних, тваринних і рослинних систем. NO також відомий тим, що він являє собою сигнальну молекулу, яка залучена в гормональну сигналізацію еукаріотичних клітин [Guo et al. 2003] та здійснення відповіді рослин на біотичний та абіотичний стрес [Hayat et al. 2010]. Є докази того, що акумуляція NO, підвищення активації СОД та проліну сприяють збереженню O²⁻ та акумуляції H₂O₂ в листках пшениці при сольовому стресі, хоча інформація про грибні ендوفіти та їхню дію на проростання (міковіталізм) майже відсутня. У даному дослідженні, виникнення NO на ранніх етапах проростання насіння пшениці AC Avonlea досліджували протягом трьох днів у присутності ендوفіта SMCD 2206 на КДА, зосереджуючи увагу на відповіді первинного кореня на молекули, які дифундують від грибів. NO в первинному корені (ранній кореневий орган) культур проростків візуалізували за допомогою флуоресцентної мікроскопії зі застосуванням специфічного зонда 4,5-diaminofluoresce у діацетаті; оцінку проводили після п'ятихвилинного впливу грибним ексудатом, достатнього для індукції значного накопичення NO [Calcagno et al. 2012]. Так, ексудат SMCD 2206 викликав синтез значної кількості NO в тканинах кореня пшениці; не обмежуючи теорію, можливо, що такий синтез регулюється шляхом молекулярного діалогу при симбіозі у пшениці.

Матеріали та способи

Накопичення NO в тканинах первинного кореня аналізували в проростаючому насінні

пшениці AC Avonlea (in vitro, підхід представлений у Прикладі 12) за допомогою проникаючої у клітину NO-специфічної проби DAF-2DA, згідно з Calcagno et al. [2012], яка перетворюється на флуоресцентне похідне тріазолу DAF-2T в реакції з NO. Утворення DAF-2T візуалізували за допомогою флуоресцентної мікроскопії (Carl Zeiss Axioscop 2). Проростки AC Avonlea оцінювали через 5 хв після обробки ексудатом грибів SMCD 2206 за допомогою наступної процедури, запропонованої Nakatsubo et al. [1998].

Специфічність відповіді на ендofіт SMCD 2206 підтвердили відсутність відповіді в не інокульованих клітинах первинного кореня. Аналіз був проведений трьома незалежними біологічними повтореннями.

Результати та їхнє обговорення

Обробка насіння грибним ексудатом може імітувати – в якійсь мірі – наближення гіф ендofітів під час пресимбіотичної фази взаємодії, як це було запропоновано для мікоризи AM при співкультивуванні з корінням арабідопсиса [Calcagno et al. 2010]. Грибний ексудат, отже, можна з упевненістю застосовувати для перевірки того, чи викликають сигнальні молекули накопичення NO, які дифундують від грибів, під час проходження в тканинах хазяїна пшениці (Фігура 51) підвищення міковітальності на ранніх етапах проростання.

Доказ на клітинному рівні, отже, припускає, що накопичення NO являє собою новий компонент сигнального шляху, який призводить до формування пов'язаного з міковіталізмом симбіозу насіння пшениці (Фігура 51). Дане відкриття має як теоретичну, так і практичну цінність для удосконалення технік пренатального догляду за рослинами з використанням ендofітних симбіонтів.

Приклад 15

Вивчення ефектів ендofітів у фітореMediaції та фіторекламації

ФітореMediaції являють собою перспективну екотехнологію. Було показано, що вона економічно вигідна для відновлення ґрунтів, забруднених вуглеводнями/нафтою, солями та важкими металами. У даному дослідженні буде вивчено вплив хвойних (*Picea* або *Pinus*) та листяних (*Salix* або *Populus*) дерев, чагарників (*Caragana* або *Krascheninnikovia*) та трав'янистих рослин (*Festuca* або *Elymus*), інфікованих (E+) і не інфікованих (E-) ендofітними організмами (через інфікування посадкового матеріалу, насіння або кореня і шляхом колонізації) (SMCD 2204, 2206, 2208, 2210 і 2215) на розпад, перетворення або деградацію нафтових вуглеводнів на забруднених нафтою ґрунтах. Рослини будуть культивуватися в вегетаційних посудинах, що містять забруднений і не забруднений нафтою ґрунт. Рослини будуть інокульовані та будуть інкубуватися протягом 6 місяців з використанням парникового способу, запропонованого Soleimani et al. (2010). Незасіяні горщики будуть використані в якості контролю. В кінці експерименту, колонізація коренів рослин (Abdellatif et al. 2009), гідрофобність ґрунту (Chau 2012), загальний вміст гідрокарбонатів нафти (TPH) та поліциклічних ароматичних гідрокарбонатів (PAH) буде проаналізовано (Germida et al. 2010). Відмінності в біомасі коренів та пагонів у E+ і E- рослин, а також ефективність фотосинтезу в листках будуть співставлені (Hubbard et al. 2012) з виведенням PAH і TPH в ризосфері рослин. Незасіяні горщики будуть використовуватися в якості контролю при розрахунку ефективності розкладання нафтових вуглеводнів симбіотичними (E+) рослинами (Soleimani et al. 2010). Інфіковані рослини будуть розкладати, перетворювати або викликати деградацію вуглеводнів та солей, поглинати, накопичувати, прибирати або усувати важкі метали та радіоактивні ізотопи на забрудненій ділянці ґрунту або навколишнього середовища.

Хоча даний винахід було описано з посиланням на те, що в даний час розглядається в якості прикладів, слід розуміти, що даний винахід не обмежений розкритими прикладами. Навпаки, винахід охоплює різні модифікації та еквівалентні схеми, що потрапляють в рамки суті і об'єму винаходу, як визначено в доданій формулі винаходу.

Усі публікації, патенти та заявки на патенти, зазначені в даному документі, включені в якості посилання у всій повноті тією ж мірою, якби кожна окрема публікація, патент або патентна заявка були конкретно та індивідуально вказані і включені за допомогою посилання в усій своїй повноті.

Таблица 1

<p><i>2204 ITS pДНК</i></p> <p>CCTATAGCTGACTGCGGAGGGACATTACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATG TTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGG GGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAA TTAATAAATTA AAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCA CCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGAC CGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGG GAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTG CCCCAGTAACGAA (SEQ ID NO:1)</p>
<p><i>>2204FITS pДНК</i></p> <p>TCGATCTAGCTCATAGTGACTGCGGAGGGACATTACAAGTGACCCCGGTCTAACCAC CGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTT CGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTA AACTTAATTAATAAATTA AAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCG TCATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGAAACGCGGACCGACGCGTGCCTC AAATCGACCGGCAGGGTCTTCTGTCCCCTAAACGTTGTGAAAATTATTCGATAAAGG ATGTTCCGTGCTACATTGTGAATAGAACCGCATTTATAACATTGATTATAAACTAAT TACGACTACATGGTAAGATAGATATATCAAGGAACTTCCTCTAAATGACCAAGAAA CC (SEQ ID NO:2)</p>

Таблица 1(Продовження)

<p>>2206 ITS <i>pДНК</i></p> <p>TCGACGGCGTATCCTAGTGACTGCGGAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGT CCAACCTCCCACCCGTGTTTAATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGG CCGCCGGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCT GTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGA TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT GCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGG GGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCC CCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGT CCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAT CAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA (SEQ ID NO:3)</p>
<p>> 2208 ITS <i>pДНК</i></p> <p>TAACTGATTTGGCGGACTGGCGGAAGGACATTAAAGAGACGTTGCCCTTCGGGGTA TACCTCCCACCCTTTGTTTACCTTTTCCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCCGTCCTCGGACC ACCGGTTTCGGCTGGTCAGTGCCCGCCAGAGGACCTAAAACTCTGTTTGTTCATATT GTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTC GAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCTGCCGGTCCCGGCAG GCCTTAAAATCATTGGCGGTGCCATTCGGCTTCAAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTTTG GAGACCCGGGTGCGTGCTTGCCATCAACCCCCAATTTTTTCAGGTTGACCTCGGATC AGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA ACAGGGATTGTCCCAATAACGAATTTATAAATAATA (SEQ ID NO:4)</p>

Таблиця 1(Продовження)

>2210 ITS *pДНК*

TCGAGAGTTCGGACTAAGTGCCTGATCCGAGGTCAAGACGGTAATGTTGCTTCGTGG
 ACGCGGGCCACGCCCCCCCCGACAGCGCAATTGTGCTGCGCGAGAGGAGGCAAGGAC
 CGCTGCCAATGAATTTGGGGCGAGTCCGCGCGCGAAGGCGGGACAGACGCCCCAACA
 CCAAGCAGAGCTTGAGGGTGTAGATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATAC
 CAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA
 CTAATTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCATTGTT
 GAAAGTTGTAACGATTGTTTGTATCAGAACAGGTAATGCTAGATGCAAAAAAGGTT
 TTGTTAAGTTCCAGCGGCAGGTTGCCCCGCCGAAGGAGAACGAAAGGTGCTCGTAA
 AAAAAGGATGCAGGAATGCGGCGCGTGAGGGTGTTACCCCTACCACCCGGGAGAGA
 ACCCCCCGAGGGCCGCGACCGCACCTGGTTGAGATGGATAATGATCCTTCCGCAGGTT
 CACCTACGGAAACC (SEQ ID NO:5)

>2215 16S *pДНК*

CCGGGGGCACTCCACTGCGTATGTGTGACGAGTAGACCGCTGCGCTTAGCTGAGGTC
 TGATGAAATGTAGAACACTTAACAAAAATATGCCCGGATGGATATACTTTTCAACG
 ACAGGGCTGCGATTGGATGATCTCCTTTGAAACACAGAACTAGTCACGGCGACGAA
 TACTCAACTTCGACCCCCCCCCCTTTCTGGAGGCGCGTCTTAGTCCCCTCCTTGATGGA
 GCTGCCCCGTGCTCGGCGGCCGGAGTCGGCGGTGTTTTCCGCTGTACCTGAGACGCT
 GGACCAACTCCTTCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
 GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGC
 AGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
 GAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAGCCCGAGGCTTAACCTCGGGTC
 TGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA
 GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
 CCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGT
 GCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACG
 CAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACATCCAGAGATGGGT
 GCCCCCTTGTGGTCGGCGTACAGGTCGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAG
 ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGGTGCTGCCAGCATGCCCT
 TCGGGTGATGGGACTTCACCACGGAGACCGCGGCTCCACTCCGACGAGGTGGGGGA
 CGACGTCAGTCATCATGCCCTAATGTCTGGCTG

(SEQ ID NO:6)

Таблиця 2

Частота колонізації коренів ендоефітами SMCD оцінена в 3D в первинних коренях проростків пшениці.

Ендоефіти	SMCD2204	SMCD2206	SMCD2210	SMCD2215
% колонізації	43	40	49	48

Таблиця 3

Енергія проростання (EG) та гідротермальний час (HTT) насіння пшениці, яке було вирощене під впливом спеки (36 °C), посухи (поживне середовище картопляно-декстрозний агар (КДА) плюс 8 % поліетиленгліколю (ПЕГ) 8000), поєднання спеки та посухи і в контрольних умовах in vitro. В колонках дані, які позначені (*), значно відрізняються від безендофітного контролю ($p \leq 0,05$; ANOVA, з подальшим post-hoc LSD аналізом).

Ендоефіт	Підвищена температура		Посуха		Підвищена температура та посуха		Контроль	
	EG (днів)	HTT для 50 % проростання (МПа°С днів)	EG (днів)	HTT для 50 % проростання (МПа°С днів)	EG (днів)	HTT для 50 % проростання (МПа°С днів)	EG (днів)	HTT для 50 % проростання (МПа°С днів)
SMCD 2204	3,7±0,3	91±7	2,9±0,3	52±5	2,0±0,8	22±8	1,6±0,2	65±8
SMCD 2206	2,5±0,3	62±7	1,9±0,1 *	34±2 *	2,0±0,8	22±8	1,5±0,2	61±8
SMCD 2208	3,7±0,3	91±7	3,0±0,3	53±5	4,0±1,0	43±10	1,6±0,2	65±8
SMCD 2210	1,8±0,2 *	44±5 *	2,2±0,2 *	39±3 *	1,0±0,5	11±5	1,6±0,2	65±8
SMCD 2215	2,5±0,3	62±7	2,3±0,2 *	41±3 *	1,3±0,2	14±2	1,5±0,2	61±8
Без ендоефіта	3,8±0,5	94±11	4,5±0,5	80±8	3,0±1,5	32±15	1,6±0,2	65±8

Примітка: Насіння, що використовується при визначенні EG і HTT, було отримано на другій стадії експериментів, і, отже, стерилізувалося 5 % розчином натрій гіпохлориту протягом однієї, а не трьох хвилин; SMCD – Saskatchewan Microbial Collection and Database

Таблиця 4

Ендофіти підвищують ефективність посухостійкості (DTE)
та врожайності ячменю та пшениці в умовах стресу.

Культура	Сорт	DTE [‡] (%)	Контрольні умови		Збільшення, %	Посуха		Збільшення, %
			Середня Врожайність колосків у грамах (3 рослини / посудину)	Середня Врожайність колосків у грамах (3 рослини / посудину)		Середня ВРОЖАЙНІСТЬ колосків у грамах (3 рослини / посудину)	Середня Врожайність колосків у грамах (3 рослини / посудину)	
			Е -	Е +		Е -	Е +	
	AC Avonlea (Конт)	16,1	18,27	25,52	28,41	2,94	10,62	72,32
	PT 580 Контроль	57,3	23,42	32,60	28,16	13,38	21,53	37,85
	CDC Utmost VB	72,3	20,55	35,4	41,95	16,67	29,8	44,06
	Strongfield	75,6	13,54	16,77*	19,26	10,23	14,98	31,71
Пшениця	Unity VB	75,3	20,72	26,6	22,11	15,61	23,2	32,72
	CDC Teal	76,9	19,51	30,37	35,76	14,90	25,1	40,64
	Carberry	83,8	17,31	33,07	47,66	14,52	22,9	36,59
	BW 423	85,0	13,26	25,83	48,66	12,28	21,41	42,64
	CDC Veronna	87,8	15,35	22,58	32,02	13,49	20,16	33,09
	Lillian	87,8	20,50	28,3	27,56	18,1	23,6	23,31
	Дворядний ячмінь							
	CDC Copeland	4,9	6,01	10,78	44,25	2,91	6,95	58,13
	CDC Kendall	13,2	9,93	24,19	58,95	0,32	1,03	68,93
Ячмінь	AC Metcalfe	43,2	16,5	22,4*	26,34	7,3	14,05	48,04
	New Dale	72,1	9,55	26,88	64,47	6,89	12,17	43,39
	Шестирядний ячмінь							
	Legacy	1,1	20,42	26,87*	24,00	2,26.	2,38*	5,04
	CDC Bold	57,0	9,16	19,9	53,97	5,22	7,5	30,40

‡ ефективність посухостійкості (DTE) = (Врожайність в умовах стресу/Врожайність у без стресових умовах) x100; представлені в порядку зростання в Таблиці. Сорти з високим DTE розглядаються як посухостійкі; тоді як сорти з низьким DTE розглядаються як сприйнятливі до посухи. Примітка: ефект відсутності ендофітів (Е-) або їхньої присутності (Е+) на врожайність сортів розраховувався як середнє значення трьох протестованих штамів SMCD 2206, SMCD 2210 і SMCD 2215.

* У рядках середні значення не є статистично значущими при $p \geq 0,05$.

Таблиця 5

Максимальна ідентичність послідовності *Rhizobium* в базі даних GenBank

Код доступу	Опис	Максимальна вага вирівнювання	Сумарна вага вирівнювання	Покриття	Значення E	Максимальна ідентичність
EF549401.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 83431 16S ДНК ген, часткова послідовність	1007	1007	46 %	0,0	99 %

Природний модулятор *Rhizobium* у взаємодії зі *Streptomyces* SMCD 2215**16S F (Golden) *Rhizobium* sp.**

GGAAGGGGGGCGGCTTACCATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCA
GACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTGACTACGGAATAACGCAGGGA
AACTTGTGCTAATAACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGA
TGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
ATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC
CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCT
GATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCA
CCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGCCGTA
AAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCC
TGGAAGTGTCTTTGATACTGTCGATCTGGAGAACTTCCTGCTCGAGTGATTTAC
CCACATGGCGAGCACCGGCACCCCGTTTCGACATGCAAAAAATGATGCCCAGG
CTTATGTTTGACCTGGCTGCTACGGCTCTCTTCGGCGTGGACCCCGGCCTCCTAT
CCCCGGAGATGCCACCCATGGACGCCGCGAGTCTCCATGGATATATCATGGAGG
TGGGTTTTCTCCGACTCATGATGCCGGCTTCTTGCTGGAAGTTGATGAAGCAAC
TAAACATCAGCCCTGAGAGAAAGCTTCGCATGCCGCGCAGGGTGCTCCGAGTG
TTCGTCTGGAGATGATGAAATAGACGAAGATCATCTCATGTGTCATGTTGGTAACG
ACGAGAACAAGATGGTGTGGATTTTGTGTCTTCCATCCTCCATGACCCTGACGA
TGCTGATGATGACGTGGTTCATGCTATGATGACTCGATACTGGTCGCTGCAAGC
GGATACAGTTGGGACCTACCGCTAACATGGTTCTTTCTACAACCTCCCCCAAA
CCGCATAGGATCGTGGTCAATCATTCGGCACGAACCTCTTCCCCCATTGCCTCC
AACTAGTTTATCGCTCTAGAGTTGGGGAGCCCTGTGTGACCTTTCGTACGCGA
(SEQ ID NO:7)

Таблиця 6

Набори праймерів СОД, MnСОД і Pro, що застосовуються для оцінки за допомогою qPCR експресії генів гороху [Handel], який піддавали впливу ПЕГ посухи/осмотичного стресу

Назва гену	Праймер	Послідовність
PP2A внутрішній контроль	CCACATTACCTGTATCGGATGACA (F) (SEQ ID NO: 8) GAGCCCAGAACAGGAGCTAACA (R) (SEQ ID NO: 9)	Die et.al, Planta (2010) 232:145–153
Сіль MnСОД та посуха	gcagaaaaaccctatcctccgtgct (F) (SEQ ID NO: 10) gctccaaagctccgtagtcg (R) (SEQ ID NO: 11)	Wong Vega et.al., Plant Mol. Biol. 17 (6), 1271-1274 (1991)
Горох СОД	ctgtactcgctgttggggtg (F) (SEQ ID NO: 12) gcatggatatggaagccgtg (R) (SEQ ID NO: 13)	Nakamura et.al., Plant Biotechnol. 20, 247-253 (2003)
Пролін (Pro)	aatggccgaaagcattgcc (F) (SEQ ID NO: 14) aaggacggtgatgccgatggactc (R) (SEQ ID NO: 15)	Williamson, C.L. та Slocum, R.D., Plant Physiol. 100, 1464-1470 (1992)

Таблиця 7

Оцінка ефективності способів стерилізації насіння. Насіння пророщують на картопляно-декстрозному агарі протягом 4 днів при температурі навколишнього середовища (20 °C). У кожній чашці Петрі 10 насінин пшениці.

Тип стерилізації	Картопляно-декстрозний агар (КДА)	
	Контамінація	Проростання
Контроль	50 %	80 %
50 % Відбілювач	0	50 %
95 % Етиловий спирт	0	70 %
50 % Відбілювач + 95 % Етиловий спирт	0	50 %
Газоподібний хлор	0	80 %

Таблиця 8

Середня схожість насіння пшениці при холодівій та біологічній стратифікації

День	Контроль	Холодова стратифікація	Непряма обробка ендосфітами	Пряма обробка ендосфітами
1	6,66±6,66 ^{ab}	16,6±3,33 ^{ab}	0,00±0,00 ^a	26,6±12,02 ^b
2	16,6±8,81 ^p	40,0±11,5 ^{pq}	50,0±5,77 ^q	66,6±8,81 ^q
3	33,3±12,01 ^x	53,3±8,81 ^{xy}	73,3±3,33 ^{yz}	86,9±7,24 ^z

* Тест Дункана здійснювали для перевірки значимості відмінностей між групами (Контроль, Холодова стратифікація, Непряма обробка ендосфітами, Пряма обробка ендосфітами) в День 1 (a, b, c), День 2 (p, q), і День 3 (x, y, z)

** Різні літери відображають наявність значущих відмінностей при P < 0,05

Таблиця 9

мРНК транскрипційного фактору Myb2 (158 п.н)		
TaMyb2 1F	acatcaagcgcggaacttca	(SEQ ID NO: 16)
TaMyb2 1R	gagccgcttcttgagggtgggtgt	(SEQ ID NO:17)
мРНК транскрипційного фактору Myb1 (152 п.н)		
TaMyb1 1F	ccagggaggacggacaacga	(SEQ ID NO:18)
TaMyb1 1R	ctctgcgccgtctcgaagga	(SEQ ID NO:19)

Джерела інформації

- Abdellatif et al. 2009. Mycological Research, 113:782-791.
- 5 Abdellatif et al. 2010. Can JPlant Pathol, 32: 468-480.
- Adriaensen et al. 2006. Mycorrhiza, 16: 553-558.
- Agius et al. 2006. PNAS, 103:11796-11801.
- Ali et al. 1994. Annals of Applied Biology, 125: 367-375.
- Allen 1958. Forest Chron, 34: 266-298.
- 10 Armas et al. 2004. Ecology, 85: 2682-2686.
- Arnold et al. 2001. Mycological Research, 105: 1502-1507.
- Bacon and White 2000. In: Bacon CW and White JFJ (Eds), Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc; New York, NY, USA. 237-263.
- Bae et al. 2009. J Exp Bot 60: 3279-3295.
- 15 Baird et al. 2010. Mycorrhiza. 20: 541-549.
- Barrero et al. 2009. Plant Physiology, 150: 1006-1021.
- Baskin et al. 1992. International Journal of Plant Sciences, 153: 239-243.
- Baskin and Baskin 2004. Sci. Res., 14: 1-16.
- Bewley and Black 1982. Physiology and Biochemistry of Seeds. 2. Viability, Dormancy, and
- 20 Environmental Control. springer-Verlag, Berlin.
- Bloom and Richard 2002. ASAE Paper No 027010. ASAE, St. Joseph, MI.
- Bogatek and Lewak 1988. Physiologia Plantarum, 73: 406-411.
- Boyko and Kovalchuk 2008. Environmental and Molecular Mutagenesis, 49: 61-72.
- Bradford 2002. In: J. Kigel J, Galili G (eds), Seed Develop and Germin. Marcel Dekker Inc, New
- 25 York, pp. 351-396.
- Calcagno et al. 2012. Mycorrhiza, 22:259-69.
- Cao and Moss. 1989. Crop Sci, 29: 1018-1021.
- Carpita et al. 1983. Physiologia Plantarum 59: 601-606.
- Cavieres and Arroyo, 2000. Plant Ecology149:1-8.
- 30 Cavieres and Arroyo, 2000b. Gayana Botanica 64: 40-45.
- Charlton et.al.2008. Metabolomics, 4: 312-327.
- Chau et al. 2012. Fungal Biology, 116:1212-1218.
- Chipanshi et al. 2006. Clim Res, 30: 175-187.
- Choi and Sano, 2007. Molecular Genetics and Genomics, 277: 589-600.
- 35 Davitt et al. 2010. New Phytol, 188: 824-834.
- de Bary 1866. Vol. II. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Leipzig, Germany.
- Desfeux et al., 2000. Plant Physiology, 123: 895-904.
- Dong-dong et al. 2009. J Zhejiang Univ-Sci B, 9: 964-968.
- Farquhar and Richards 1984. Australian Journal Plant Physiology 11:539-552.
- 40 Farquhar et al. 1989 In: Jones HG, Flowers TJ and Jones MB (Eds) Plants under stress. Cambridge University Press, Cambridge, pp 47-69.
- Farquhar et al. 1989b. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.40: 503-537.
- Finnegan et al. 1998. Plant Molecular Biology 95: 5824-5829.

- Freeman 1904. Philosophical Transactions of the Royal Society London (Biology) 196: 1-27.
- Friend et al. 1962. Can J Bot, 40: 1299-1311.
- Gan et al. 2004. Can. J Plant Sci, 84: 697-704.
- Germida et al. 2010. Field-scale assessment of phytoremediation at a former oil tank battery in
5 Bruderheim, Alberta. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, 1-6
August 2010. Brisbane, Australia. Available on-line at:
<http://www.iuss.org/19th%20WCSS/Symposium/pdf/0694.pdf>
- Gizinger 2002. Experimental Hematology, 30: 503-512.
- Gornall et al. 2010. Phil. Trans. R. Soc. B, 365, 2973-2989.
- 10 Grant et al. 2009. Tree Physiology, 29: 1-17.
- Gummerson 1986. J Exp Bot, 37: 729-741.
- Gundel et al. 2010. Evol Appl, 3: 538-546.
- Guo et al. 2003. Science, 302: 100-103.
- Hayat et al. 2010. Nitric Oxide in Plant Physiology, Issue 58, Willey-VCH Verlag, Germany.
- 15 Hedden and Phillips, 2000. Trends in Plant Science, 5: 523-530.
- Hubbard et al. 2011. In: Wheat: Genetics, Crops and Food Production. Nova Science Publishers
Hauppauge, NY, USA. pp. 333-345.
- Hubbard et al. 2012. Botany, 90(2): 137-149.
- Jame et al. 1998. Agric Forest Meteorol 92: 241-249.
- 20 Ji et al., 2011. Plant Physiology, 156: 647-662.
- Johannes et al. 2009. Plos Genetics 5: e1000530.
- Johannes et al. 2011. Genetics, 188: 215-227.
- Johnson et al. 1990. Crop Science, 30: 338-343.
- Jost et al. 2001. Nucleic Acids Research, 29: 4452-4461.
- 25 Jumpponen and Trappe 1998. New Phytologist, 140: 295-310.
- Jurado et al., 2010. Food Microbiology, 27: 50-57.
- Kane 2011. Environmental and Experimental Botany, 71: 337-344.
- Kang et al. 2008. International Journal of Sustainable Development and World Ecology, 15: 440-
447.
- 30 Karavata & Manetas 1999. Photosynthetica, 36: 41-49.
- Khan et al. 2010. Pakistan Journal of Botany, 42: 259-267.
- Khan et al. 2012. BMC Microbiol, 12: 12:3.
- Kiffer and Morelet 2000. Science Publisher Inc, Enfield, NH, Plymouth.
- Köchy and Tielbörger 2007. Basic Appl Ecol 8: 171-182.
- 35 Koyuncu 2005. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47: 23-26.
- Labeda et al 2012. Antonie van Leeuwenhoek, 101:73-104.
- Lang-Mladek et al. 2010. Molecular Plant, 3: 594-602.
- Larran et al. 2002. World Journal of Microbial Biotechnology, 18: 683-686.
- Leone et al. 1994. Physiol Plantarum, 92: 21-30.
- 40 Li et al. 2008. Ecological Research, 23: 927-930.
- Li et al. 2011. Agronomy Journal, 103: 1619-1628.
- Lu et al. 2007. Plant Biology, 49: 1599-1607.
- Lucht et al. 2002. Nature Genetics, 30: 311-314.
- Madsood et al. 2005. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 18: 115-125.
- 45 Margulis, 1991. In Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation, L. Margulis and R. Fester,
ed. The MIT Press: Cambridge. pp. 1-14.
- Marquez et al. 2007. Science, 315: 513-515.
- McCormick MC, Siegel (eds.) 1999. Prenatal Care: Effectiveness and implementation. Cambridge
University Press UK.
- 50 McDonald 2009. Handbook of biological statistics. 2nd ed. sparky House Publishing, Baltimore,
Maryland.
- McMaster 2009. In: Carver BF (ed), Wheat, science and trade, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, pp.
31-55.
- Milberg and Andersson 1998. Plant Ecology, 134: 225-234.
- 55 Millar et al., 2006. Plant Journal, 45: 942-954.
- Miransari et al. 2011. Applied Microbiology and Biotechnology, 92: 875-885.
- Mitchell et al., 2009. Microbiology-SGM, 156: 270-277.
- Mühlmann and Peintner 2000. Mycorrhiza, 18: 171-180.
- Mukhopadhyay et al., 2004. PNAS, 101: 6309-6314.
- 60 Nakatsubo et al. 1998. FEBS Lett, 427:263-266.

- Nakamura et al., 2010. *Euphytica*, 171: 111-120.
 Nelson, 2004. *Annu Rev Phytopathol*, 42: 271-309.
 Nicot 2005. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2907-2914.
 Nonogaki et al., 2010. *Plant Science*, 179: 574-581.
 5 Oikawa et al., 2004. *Plant Molecular Biology*, 55: 687-700.
 Okamoto et al., 2006. *Plant Physiology*, 141:97-107.
 Oliver et al., 2007. *Plant and Cell Physiology*, 48: 1319-1330.
 Penterman et al. 2007. *PNAS*, 104: 6752-6757.
 Phillips et al., 1995. *Plant Physiology*, 108: 1049-1057.
 10 Probert et al., 1989. *Journal of Experimental Botany*, 40: 293-301.
 Qin and Zeevart, 1999. *PNAS*, 96: 15354-15361.
 Reynolds et al. 2007 *Journal of Experimental Botany*, 58: 177-186.
 Richards et al. 2002. *Crop Science*, 42: 111-121.
 Ries et al. 2000. *Nature*, 406: 98-101.
 15 Rivero et al. 2011. International Conference on Arabidopsis Research. June 22-25, Madison USA.
 Ruan et al. 2002. *Seed Sci Technol*, 30: 61-67.
 Ryan et al. 2008. *FEMS Microbiol Lett*, 278: 1-9.
 Saikkonen et al., 1998. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319-343.
 Saze 2008. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19: 527-536.
 20 Schrey and Tarkka 2008. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94:11-19.
 Schutz and Rave 1999. *Ecology*, 144: 215-230.
 Semenov and Shewry 2011. *Scientific Reports*, 1: 66-71.
 Sinclair et al. 1984. *BioScience*, 34:36-40.
 Singh et al. 2011. *Plant Signal Behav*, 6: 175-191.
 25 Smith and Read 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, Third Edition. Elsevier Ltd. *Mycorrhizas in achlorophyllous plants (mycoheterotrophs)*. Chapter 13: 458-507.
 Solaiman et al. 2010. *Australian Journal of Soil Research*, 48: 546-554.
 Soleimani et al. 2010. *Chemo sphere*, 81: 1084-1090.
 Stone et al., 2000. In: Bacon, C. W. and White, J. F. eds., *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker:
 30 New York Chap. 1: 3-29.
 Strobel et al., 2004. *Journal of Natural Products*, 67: 257-268.
 Sun et al. 2010. *Journal of Plant Physiolog*, 167: 1009-1017.
 Tan and Zou, 2001. *Nat Prod Rep*, 18: 448-45.
 Tokala et al. 2002. *Appl Environ Microbiol*, 68:2161-2171.
 35 Vaughn et al. 2007. *PloS Biology*, 5: 1617-1629.
 Verhoeven et al. 2010. *New Phytologis*, 185: 1108-1118.
 Vujanovic et al. 2000. *Annals of Botany*, 86:79-86.
 Vujanovic and Brisson 2002. *Mycological Progress*. 1: 147-154.
 Vujanovic and Vujanovic 2006. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotech*, 63: 563-569.
 40 Vujanovic and Vujanovic 2007. *Symbiosis*, 44: 93-99.
 Vujanovic 2007b. *Can J Plant Pathol*, 29: 451-451.
 Vujanovic 2008. 19th International Conference on Arabidopsis. Research Proceedings-ICAR13, July 23-27, Montreal, QC, Canada.
 Waller et al. 2005. *PNAS*, 102: 13386-13391.
 45 Wallin 1927. *Symbiontism and the Origin of species*. London: Baillière, Tindall and Cox.
 Wang et al. 2011. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1951-1960.
 Whalley et al. 2006. *Plant and Soil*, 280: 279-290.
 White and Torres 2010. *Physiol. Plant*, 138: 440-446.
 Wu et al. 2008. *Plant Physiology*, 148: 1953-1963.
 50 Wu and Sardo 2010. Lichtfouse E. (Ed.), *Sociology, Organic Farming, Climate Change and Soil Science*. Sustainable Agriculture Reviews. 3: DOI 10.1007/978-90-481-3333-8_3.
 Yamaguchi et al. 1998. *Plant Cell*, 10:2115-2126
 Yang et al., 2002. *Planta*, 215: 645-652.
 Zadoks et al. 1974. *Weed Research*, 14:415-421.
 55 Zhang et al., 2007. *BMC Genet*, 2007, 8: 40.
 Zhang et al. 2010. *Journal of Cereal Science*, 52: 263-269.
 Zhang et al. 2011. *African Journal of Microbiology Research*, 5: 5540-5547.
 Zhao et al. 2007. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 947-963.
 Zhong et al. 2009. *African Journal of Biotechnology*, 8: 6201-6207.
 60 Zhu et al. 2007. *Current Biology*, 17: 54-59.

Foresight. The future of food and farming: challenges and choices for global sustainability. Final Project Report. London: The Government Office for Science, UK, 2011.

IPCC Climate Change 2007. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M and Miller HL (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

5 Saskatchewan Ministry of Agriculture 2008. Varieties of Grain Crops. SaskSeed guide. Regina, SK, Canada

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> University of Saskatchewan

<120> ЕНДОФІТНІ МІКРОВНІ СИМБІОНТИ У ПРЕНАТАЛЬНОМУ ДОГЛЯДІ ЗА РОСЛИНАМИ

<130> 13764-P41875PC00

<160> 19

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 581

<212> ДНК

<213> Cladosporium sp.

<400> 1

cctatagctg actgcgagg gacattaca gtagccccg tctaaccacc gggatgttca	60
taaccctttg ttgtccgact ctgttgctc cggggcgacc ctgccttcgg gcgggggctc	120
cgggtggaca cttcaaactc ttgcgtaact ttgcagtctg agtaaactta attaataaat	180
taaaactttt aacaacggat ctcttggttc tggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg	240
ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc	300

ccctggtatt ccggggggca tgcctgttcg agcgtcattt caccactcaa gcctcgcttg 360
 gtattgggca acgcggtccg ccgcgtgcct caaatcgacc ggctgggtct tctgtcccct 420
 aagcgttgtg gaaactattc gctaaagggt gttcgggagg ctacgccgta aaacaacccc 480
 atttctaagg ttgacctcgg atcaggtagg gatacccgct gaacttaagc atatcaataa 540
 gcggaggaaa agaaaccaac agggattgcc ccagtaacga a 581

<210> 2

<211> 571

<212> ДНК

<213> Cladosporium sp.

<400> 2

tcgatctagc tcatagtac tgcggaggga cattacaagt gaccccggtc taaccacgg 60
 gatgttcata accctttgtt gtccgactct gttgcctccg gggcgaccct gccttcgggc 120
 gggggctccg ggtggacact tcaaactctt gcgtaacttt gcagtctgag taaacttaat 180
 taataaatta aaacttttaa caacggatct cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc 240
 gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac 300

attgcgcccc ctggtattcc ggggggcatg cctgttcgag cgtcatttca ccaactcaagc 360
 ctgcgttggt attgggaaac gcggaccgac gcgtgcctca aatcgaccgg cagggctctc 420
 tgtcccctaa acgtttgtgaa aattattcga taaaggatgt tccgtgctac attgtgaata 480
 gaaccgcatt tataacattg attataaaact aattacgact acatggtaag atagatatat 540
 caaggaactt cctctaaatg accaagaaac c 571

<210> 3

<211> 592

<212> ДНК

<213> Penicillium sp.

<400> 3

tgcacggcgt atcctagtga ctgcggagga tcattaccga gtgagggccc tctgggtcca 60
 acctcccacc cgtgtttaat ttaccttggt gcttcggcgg gcccgctta actggccgcc 120
 gggggggctta cgccccggg cccgcgcccg ccgaagacac cctcgaactc tgtctgaaga 180
 ttgtagtctg agtgaaaata taaattattt aaaactttca acaacggatc tcttggttcc 240
 ggcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga tacgtaatgt gaattgcaaa ttcagtgaat 300

catcgagtct ttgaacgcac attgcgcccc ctggtattcc ggggggcatg cctgtccgag 360

cgtcattgct gccctcaagc acggcttgtg tgttggggccc cgtcctccga tcccggggga 420

cggggcccgaa aggcagcggc ggcaccgcgt ccggctctcg agcgtatggg gctttgtcac 480

ccgctctgta ggcccggccg gcgcttgccg atcaacccaa atttttatcc aggttgacct 540

cggatcaggt agggataccc gctgaactta agcatatcaa taagcggagg aa 592

<210> 4

<211> 605

<212> ДНК

<213> Pseudeurotium sp.

<400> 4

taactgattt ggcggaactgg cggaaggaca ttaaagagac gttgcccttc ggggtatacc 60

tcccaccctt tgtttacctt ttcctttggt gctttggcgg gcccgctctc ggaccaccgg 120

tttcggctgg tcagtgcccg ccagaggacc taaaactctg ttgttcata ttgtctgagt 180

actatataat agttaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ttctggcatc gatgaagaac 240

gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa 300

cgcacattgc gccccctggt attccggggg gcatgcctgt tcgagcgtca ttacaaccct	360
caagctctgc ttggtattgg gctctgccgg tcccggcagg ccttaaaatc attggcggtg	420
ccattcggct tcaagcgtag taattcttct cgctttggag acccggtgc gtgcttgcca	480
tcaaccccca attttttcag gttgacctcg gatcaggtag ggataccgc tgaacttaag	540
catatcaata agcggaggaa aagaaaccaa cagggattgt cccaataacg aatttataaa	600
taata	605

<210> 5

<211> 579

<212> ДНК

<213> Paraconyothirium sp.

<400> 5

tcgagagttc ggactaagtg cctgatccga ggtcaagacg gtaatgttgc ttcgtggacg	60
cgggccacgc cccccgcag acgcaattgt gctgcgcgag aggaggcaag gaccgctgcc	120
aatgaatttg gggcgagtcc gcgcgcgaag gcgggacaga cgcccaacac caagcagagc	180
ttgaggggtg agatgacgct cgaacaggca tgcccatgg aataccaagg ggcgcaatgt	240

gcgttcaaag attcgatgat tcaactgaatt ctgcaattca cactacttat cgcatttcgc 300

tgcgttcttc atcgatgcca gagccaagag atccattggt gaaagttgta acgattgttt 360

gtatcagaac aggtaatgct agatgcaaaa aaggttttgt taagttccag cggcaggttg 420

ccccgccgaa ggagaacgaa aggtgctcgt aaaaaaagga tgcaggaatg cggcgcgtga 480

gggtgttacc cctaccaccc gggagagaac ccccgagggc cgcgaccgca cctggttgag 540

atggataatg atccttcgcg aggttcacct acggaaacc 579

<210> 6

<211> 1160

<212> ДНК

<213> Streptomyces sp.

<400> 6

ccgggggcac tccactgcgt atgtgtgacg agtagaccgc tgcgcttagc tgaggtctga 60

tgaaatgtag aacacttaac aaaaatatgc ccggatggat atacttttca acgacagggc 120

tgcgattgga tgatctcctt tgaaacacag aactagtcac ggcgacgaat actcaacttc 180

gacccccccc ctttctggag gcgcgtctta gtccctcctt tgatggagct gccccgtgct 240

cggcggccgg agtcggcggt gttttccgct gtacctgaga cgctggacca actccttcgg	300
gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gcgcaagcct gatgcagcga cgccgcgtga	360
gggatgacgg ccttcggggt gtaaacctct ttcagcaggg aagaagcgca agtgacggta	420
cctgcagaag aagcgccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggcgcaa	480
gcgttgctcg gaattattgg gcgtaaagag ctcgtaggcg gcttgtcacg tcgattgtga	540
aagcccgagg cttaacctcg ggtctgcagt cgatacgggc aggctagagt gtggtagggg	600
agatcggaat tcctgggtga gcggtgaaat gcgcagatat caggaggaac accggtggcg	660
aaggcggatc tctgggccat tactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gcgaacagga	720
ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac ggtgggaact aggtgttggc gacattccac	780
gtcgtcggtg ccgcagctaa cgcattaagt tccccgctg gggagtacgg ccgcaaggct	840
aaaactcaaa ggaattgacg gggggccgca caagcggcgg agcatgtggc ttaattcgac	900
gcaacgcgaa gaaccttacc aaggcttgac atacaccgga aacatccaga gatgggtgcc	960
cccttggtgt cggcgtagag gtcgtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg	1020
ggtaagtccc gcaacgagcg caaccttggt ctggtgctgc cagcatgcc ttcggtgat	1080

gggacttcac cacggagacc gcggctccac tccgacgagg tgggggacga cgtcagtcac 1140

catgcçctaa tgtctggctg 1160

<210> 7

<211> 1176

<212> ДНК

<213> Rhizobium sp.

<400> 7

ggaagggggg cggcttacca tgcaagtcga gcgccccgca aggggagcgg cagacgggtg 60

agtaacgcgt gggaatctac ccttgactac ggaataacgc agggaaactt gtgctaatac 120

cgtatgtgtc cttcgggaga aagatttata ggtcaaggat gagcccgcgt tggattagct 180

agttggtggg gtaaaggcct accaaggcga cgatccatag ctggtctgag aggatgatca 240

gccacattgg gactgagaca cgccccaaac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg 300

gacaatgggc gcaagcctga tccagccatg ccgcgtgagt gatgaaggcc ctagggttgt 360

aaagctcttt caccggagaa gataatgacg gtatccggag aagaagcccc ggctaacttc 420

gtgccagcag ccgcggtaat acgaaggggg ctagcgttgt tcggaattac tggccgtaaa 480

UA 121195 C2

gcgcacgtag gcggatcgat cagtcagggg tgaaatccca gggctcaacc ctggaactgt	540
ctttgatact gtogatctgg agaacttcct gctcgagtga ttaccacaca tggcgagcac	600
cggcaccocg tttcgacatg caaaaaatga tgcccaggct tatgtttgac ctggctgcta	660
cggctctctt cggcgtggac cccggcctcc tatccccgga gatgccacc atggacgccg	720
cagtctccat ggatatatca tggaggtggg ttttctccga ctcatgatgc cggcttcttg	780
ctggaagttg atgaagcaac taaacatcag ccctgagaga aagcttcgca tgccgcgcag	840
gggtgctccga gtgttcgtct ggagatgatg aaatagacga agatcatctc atgtcatgtt	900
ggtaacgacg agaacaagat ggtgtggatt ttgtgtcttc catcctccat gaccctgacg	960
atgctgatga tgacgtgggt catgctatga tgactcgata ctggtcgctg caagcggata	1020
cagttgggac ctaccgctaa catggttctt tctacaacct cccccaaac cgcataggat	1080
cgtgggtcaat cattcggcac gaacctcttc cccattgcc tccaactagt ttatcgctct	1140
agagttgggg agccctgtgt gacctttcgt acgcga	1176

<210> 8

<211> 24

<212> ДНК

<213> Горох-Pisum sativum

<400> 8

ccacattacc tgtatcggat gaca

24

<210> 9

<211> 22

<212> ДНК

<213> Горох-Pisum sativum

<400> 9

gagcccagaa caggagctaa ca

22

<210> 10

<211> 25

<212> ДНК

<213> Горох-Pisum sativum

<400> 10

gcagaaaaac cctatcctcc gtgct

25

<210> 11

<211> 20

<212> ДНК

<213> Горox-Pisum sativum

<400> 11

gctccaaagc tccgtagtcg

20

<210> 12

<211> 20

<212> ДНК

<213> Горox-Pisum sativum

<400> 12

ctgtactcgc tggtgggggtg

20

<210> 13

<211> 20

<212> ДНК

<213> Горox-Pisum sativum

<400> 13

gcatggatat ggaagccgtg

20

<210> 14

<211> 20

<212> ДНК

<213> Горох-*Pisum sativum*

<400> 14

aatggccgaa agcattgcc

20

<210> 15

<211> 24

<212> ДНК

<213> Горох-*Pisum sativum*

<400> 15

aaggacggtg atgccgatgg actc

24

<210> 16

<211> 21

<212> ДНК

<213> Пшеница-*Triticum aestivum*

<400> 16

acatcaagcg cggcaacttc a

21

<210> 17

<211> 23

<212> ДНК

<213> Пшениця-Triticum aestivum

<400> 17

gagccgcttc ttgaggtggg tgt

23

<210> 18

<211> 20

<212> ДНК

<213> Пшениця-Triticum aestivum

<400> 18

ссagggagga сggасаасга

20

<210> 19

<211> 20

<212> ДНК

<213> Пшениця-Triticum aestivum

<400> 19

ctctgcgccg tctcгаagga

20

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування ендоефіта або його культури, який являє собою штам *Streptomyces* sp. або його культуру, який депонований за номером IDAC 081111-06, або який містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6, для підвищення біомаси кореневих волосків злакових культур, причому застосування включає обробку насіння злакової культури ендоефітом або його культурою та культивування насіння злакової культури до рослини першого покоління.
2. Застосування за п. 1, в якому злакова культура являє собою пшеницю.
3. Застосування ендоефіта або його культури, який являє собою штам *Streptomyces* sp. або його культуру, який депонований за номером IDAC 081111-06, або який містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6, для підвищення довжини листя злакових культур, причому застосування включає обробку насіння злакової культури ендоефітом або його культурою та культивування насіння злакової культури до рослини першого покоління.
4. Застосування за п. 3, в якому злакова культура являє собою пшеницю.
5. Застосування ендоефіта або його культури, який являє собою штам *Streptomyces* sp. або його культуру, який депонований за номером IDAC 081111-06, або який містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6, для підвищення врожайності злакових культур, причому застосування включає обробку насіння злакової культури ендоефітом або його культурою та культивування насіння злакової культури до рослини першого покоління.
6. Застосування за п. 5, в якому злакова культура являє собою пшеницю.
7. Застосування ендоефіта або його культури, який являє собою штам *Streptomyces* sp. або його культуру, який депонований за номером IDAC 081111-06, або який містить послідовність 16S рДНК, що представлена в SEQ ID NO: 6, для підвищення протидії патогенам злакових культур, причому застосування включає обробку насіння злакової культури ендоефітом або його культурою та культивування насіння злакової культури до рослини першого покоління.
8. Застосування за п. 7, в якому злакова культура являє собою пшеницю.

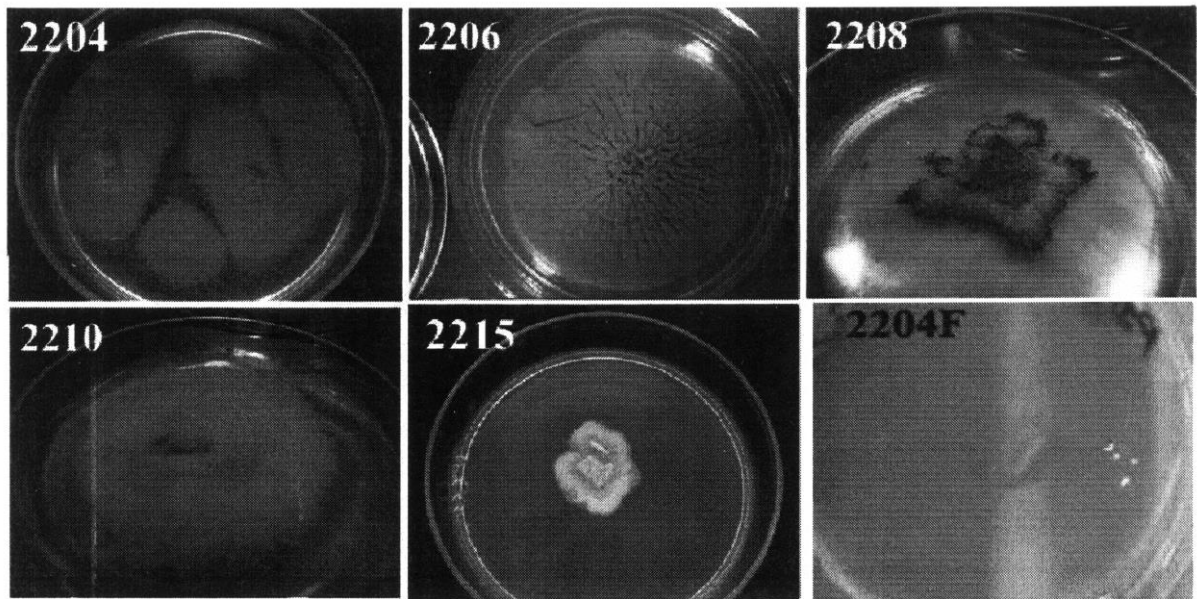
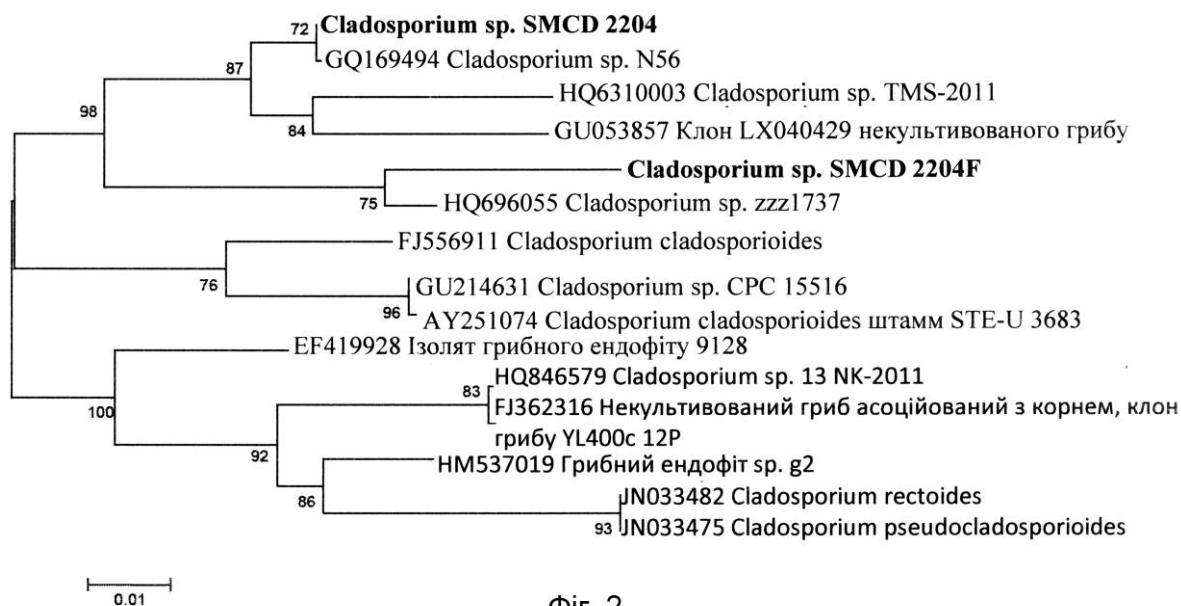


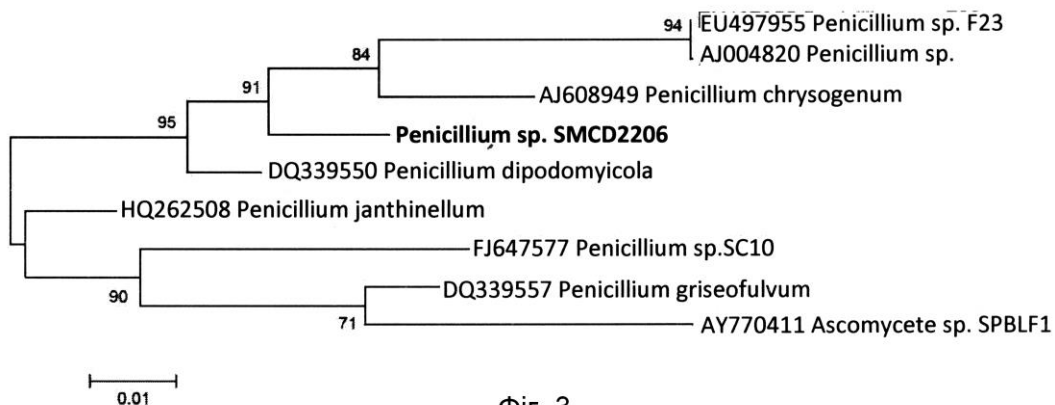
Fig. 1

Capnodiales



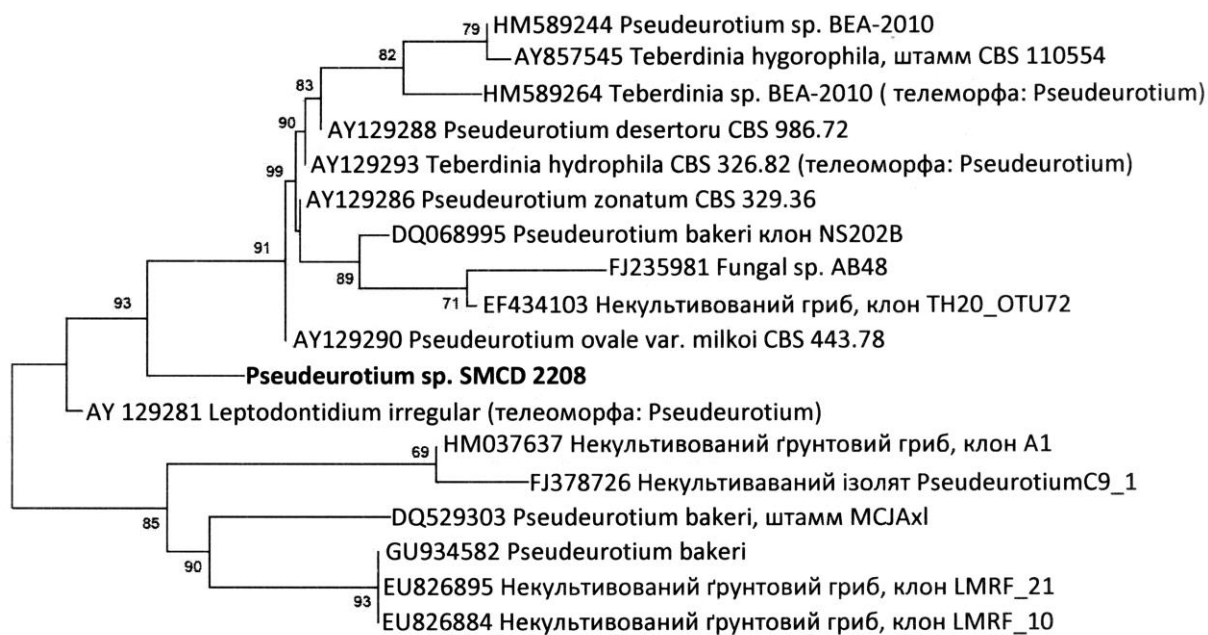
Фіг. 2

Eurotiales



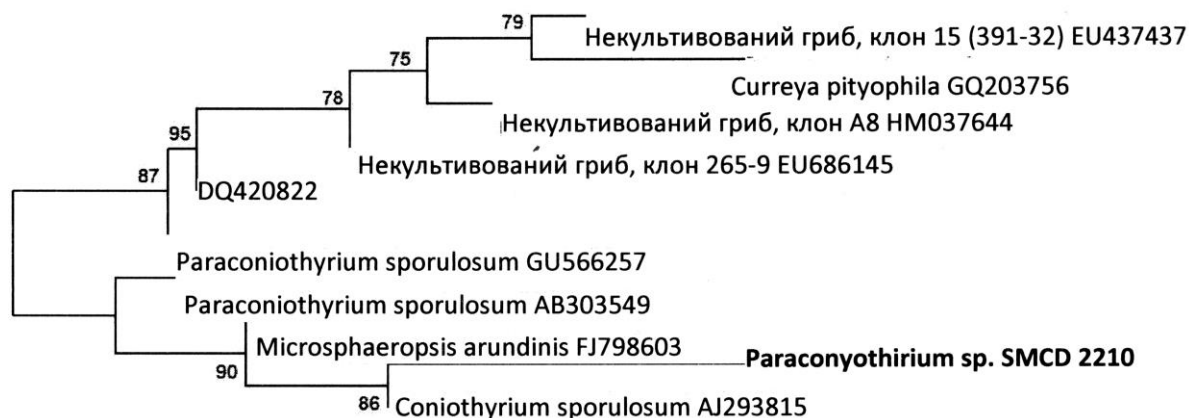
Фіг. 3

Insetrae sedis: Helotiales (?)



Фіг. 4

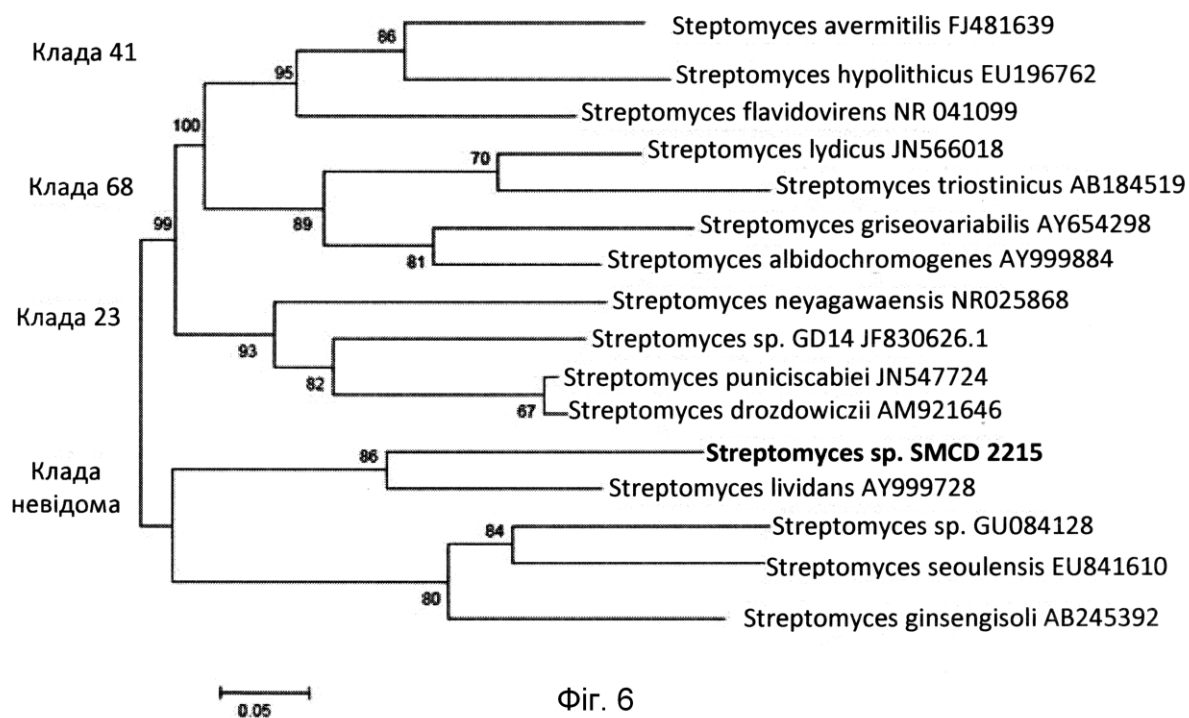
Pleosporales



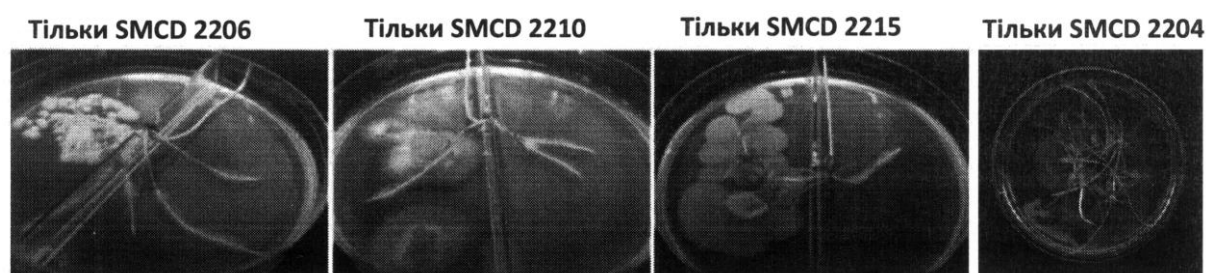
Фіг. 5

NC81 BlastNucleotdenослiдовнiсть
Послiдовностi за якими проводиться вирiвнювання

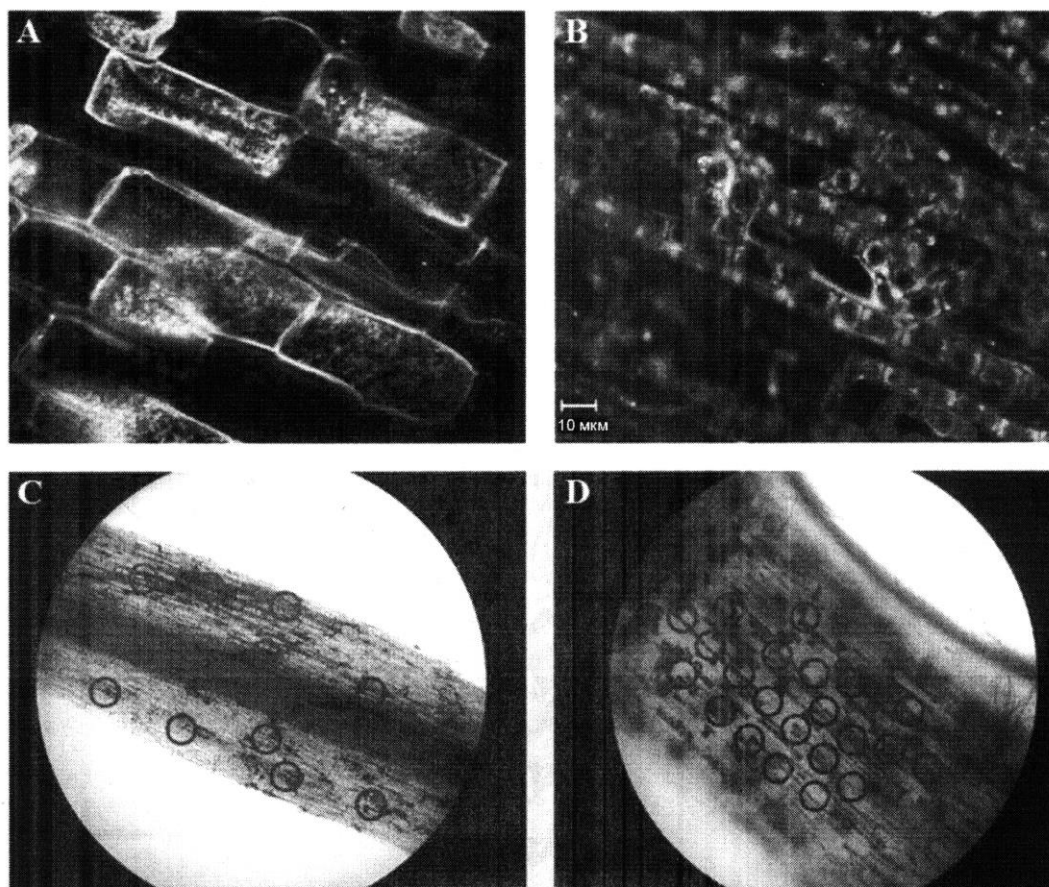
Шифр доступу	Опис	МВВ	ЗВВ	Покриття	Е	Макс. iд
GU084128.1	Streptomyces sp. A3(2009b) Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1482</u>	1482	75%	0.0	97%
GU084133.1	Streptomyces sp. A8(2009b) Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1482</u>	1482	75%	0.0	97%
GU084126.1	Streptomyces sp. A161(2009b) Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1482</u>	1482	75%	0.0	97%
GU084127.1	Streptomyces sp. A164(2009b) Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1476</u>	1476	75%	0.0	97%
GU084129.1	Streptomyces sp. A4 Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1471</u>	1471	75%	0.0	97%
CF830626.1	Streptomyces sp. GD14 Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1465</u>	1465	75%	0.0	97%
GO857655.1	Streptomyces sp. CN-23 Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1465</u>	1465	75%	0.0	97%
GU084131.1	Streptomyces sp. A6(2009b) Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1463</u>	1463	75%	0.0	97%
GU084132.1	Streptomyces sp. A7(2009b) Ген рибосом. 16S РНК, частина посл.	<u>1463</u>	1463	75%	0.0	97%



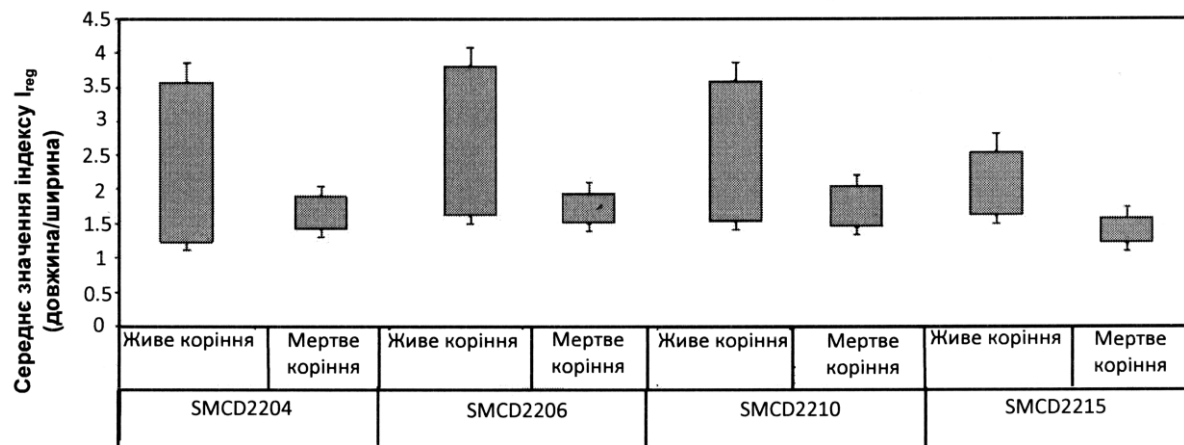
Фіг. 6



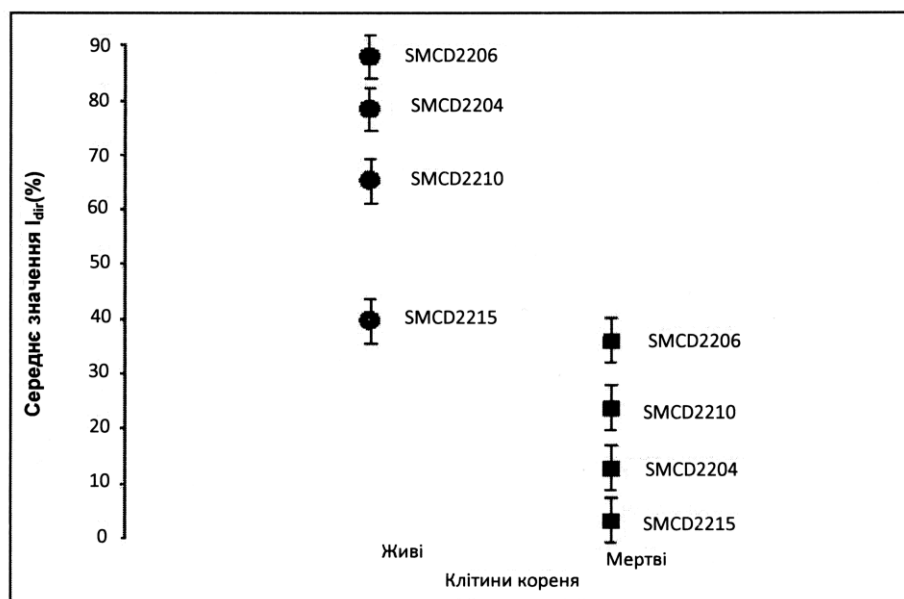
Фіг. 7



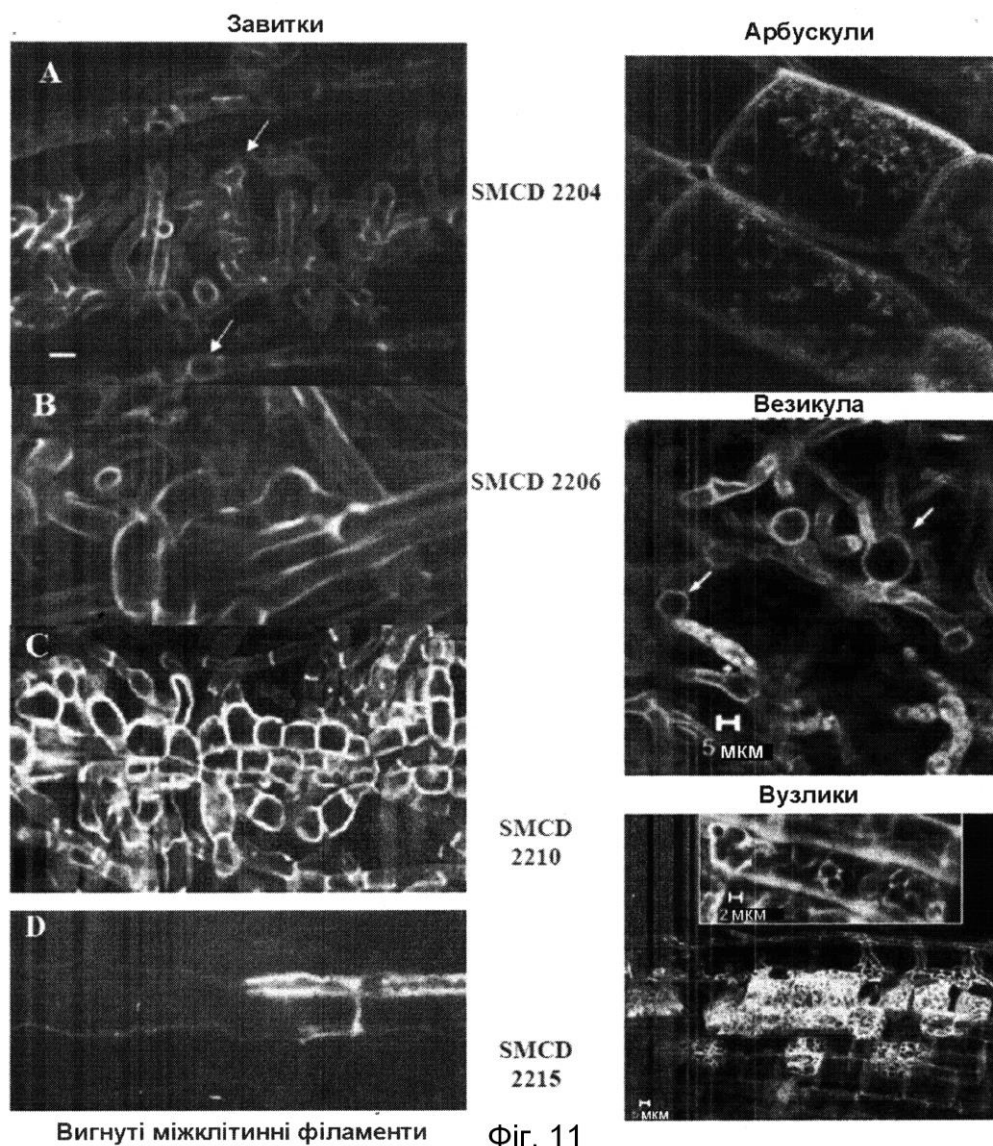
Фіг. 8



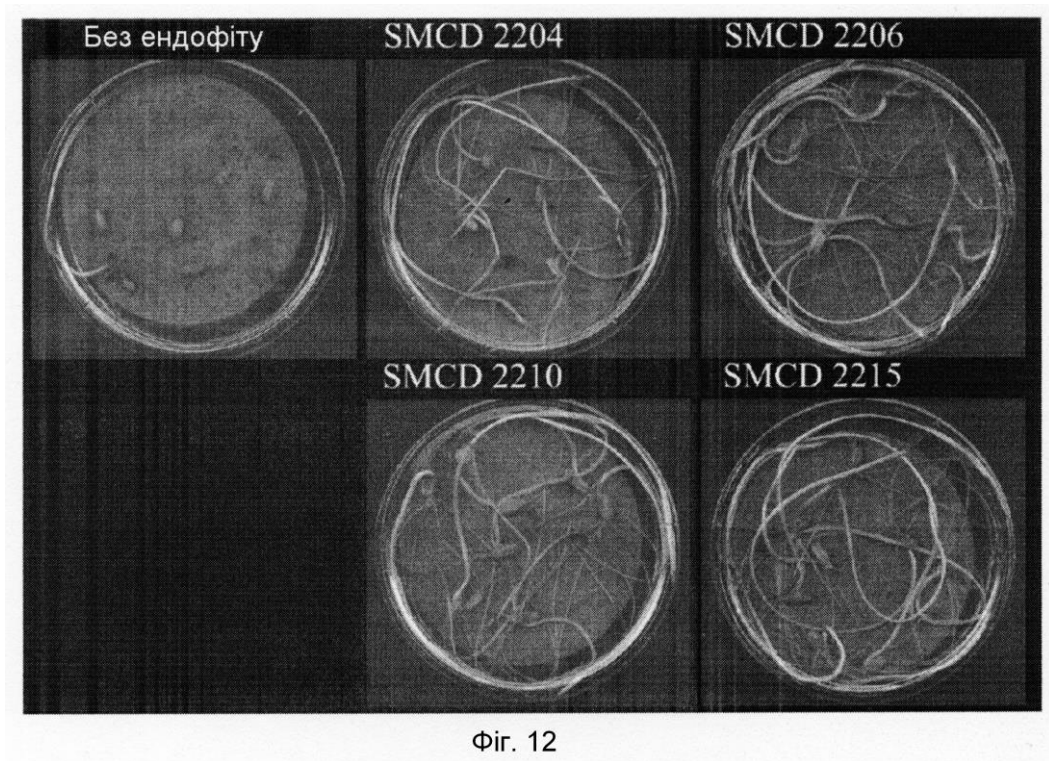
Фіг. 9



Фіг. 10



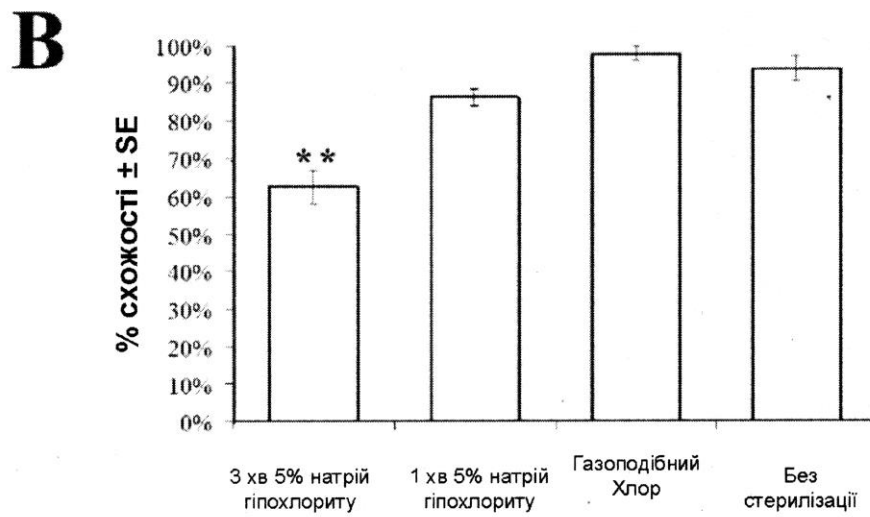
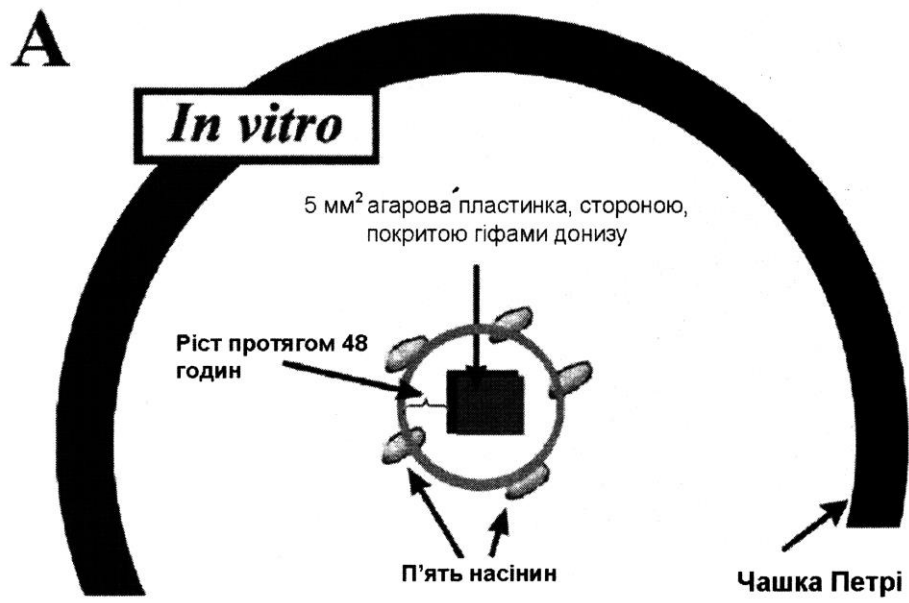
Фіг. 11



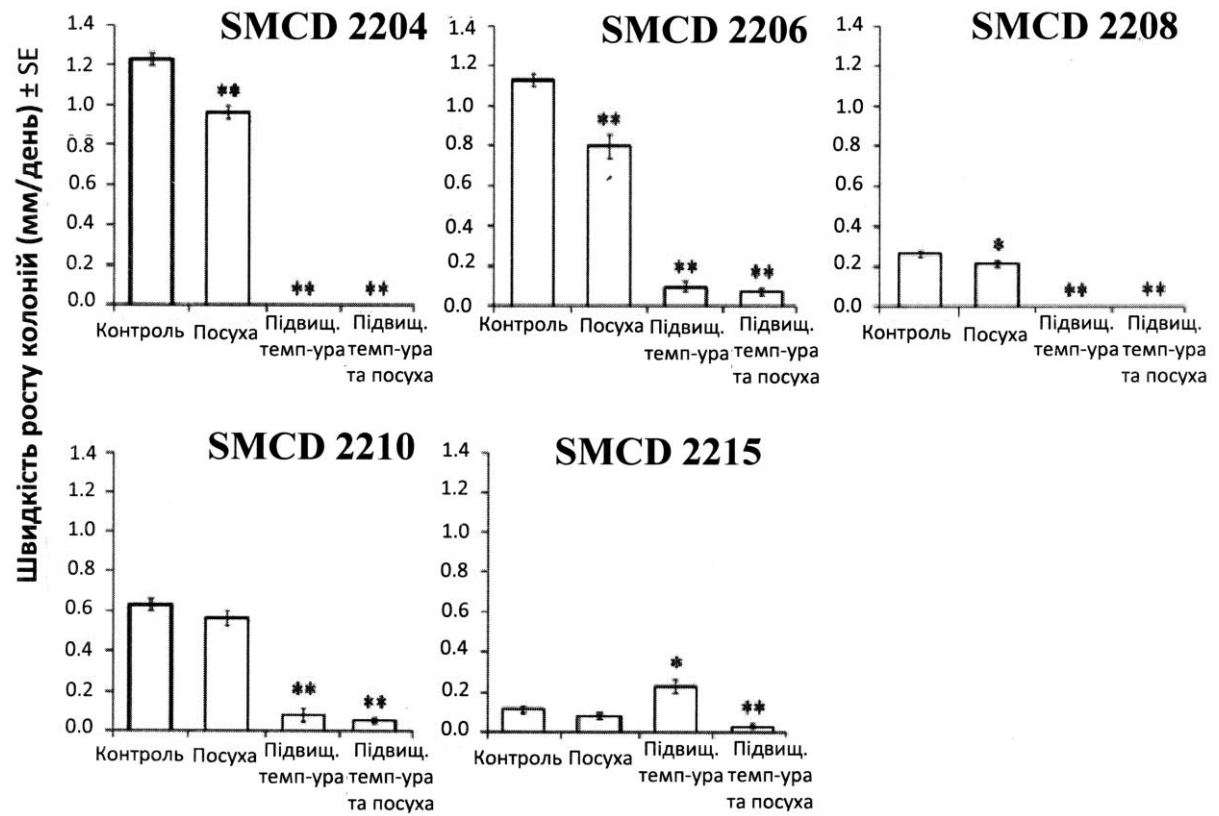
Фіг. 12



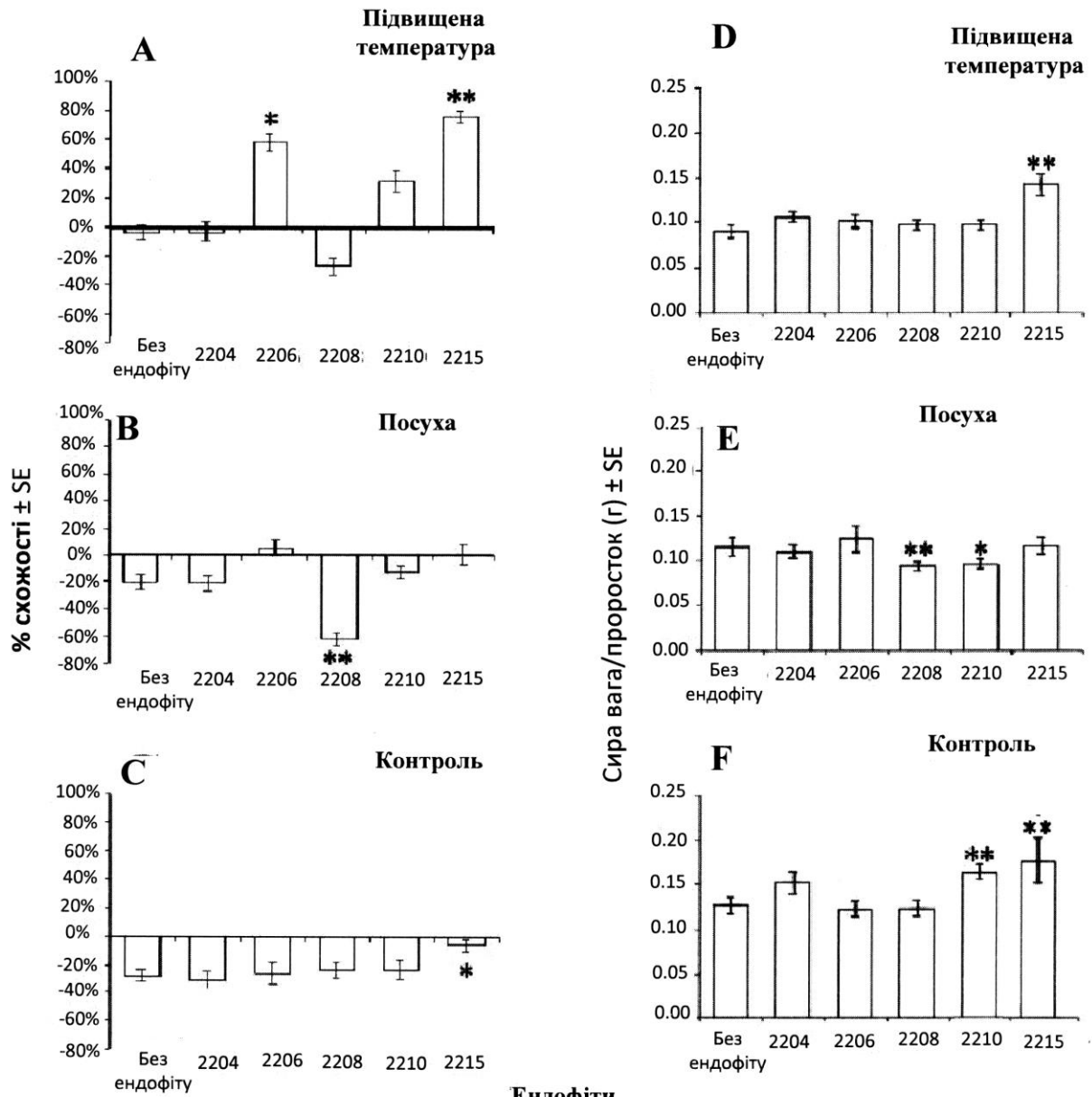
Фіг. 13



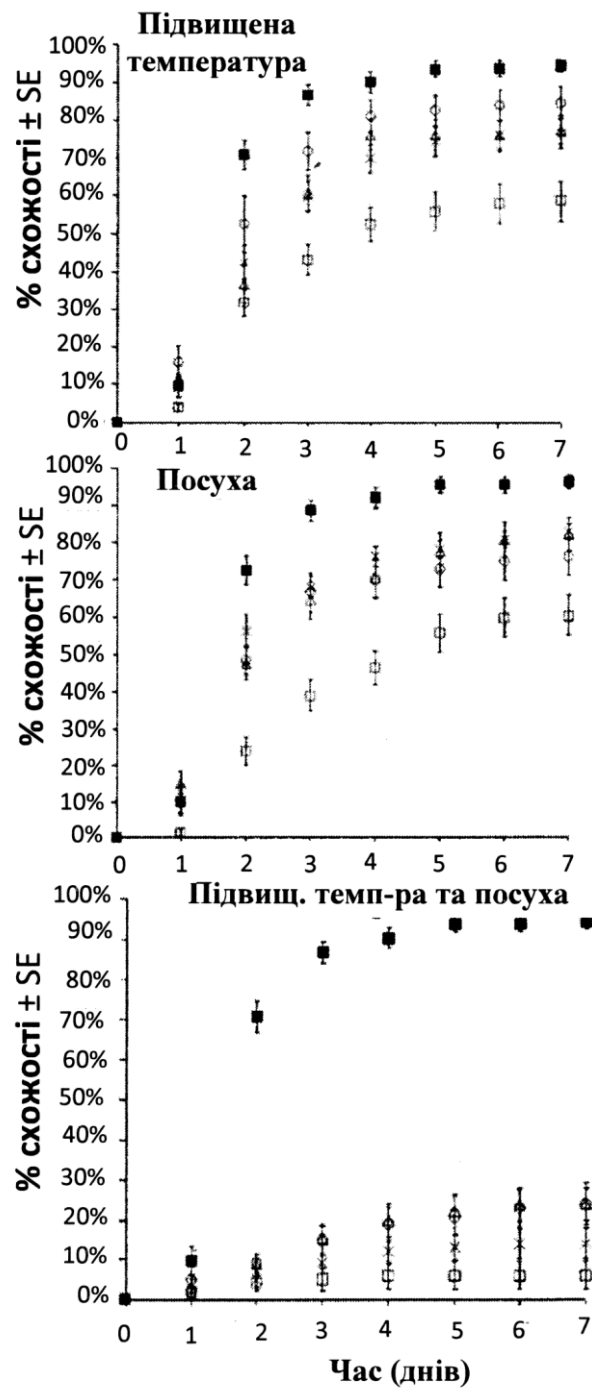
Фіг. 14



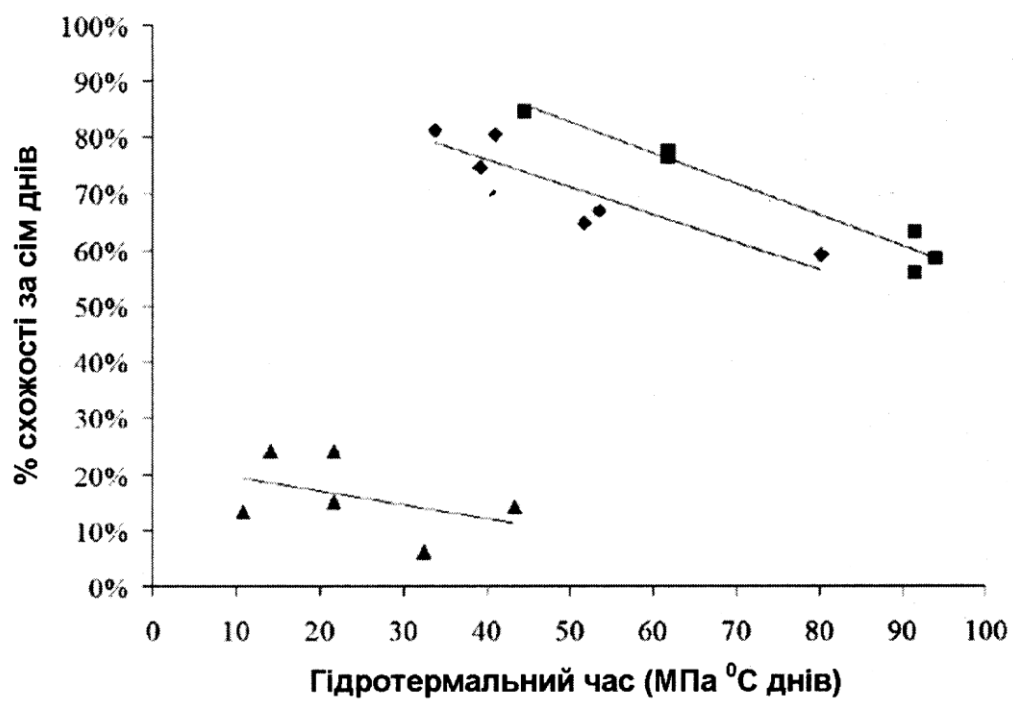
Фіг. 15



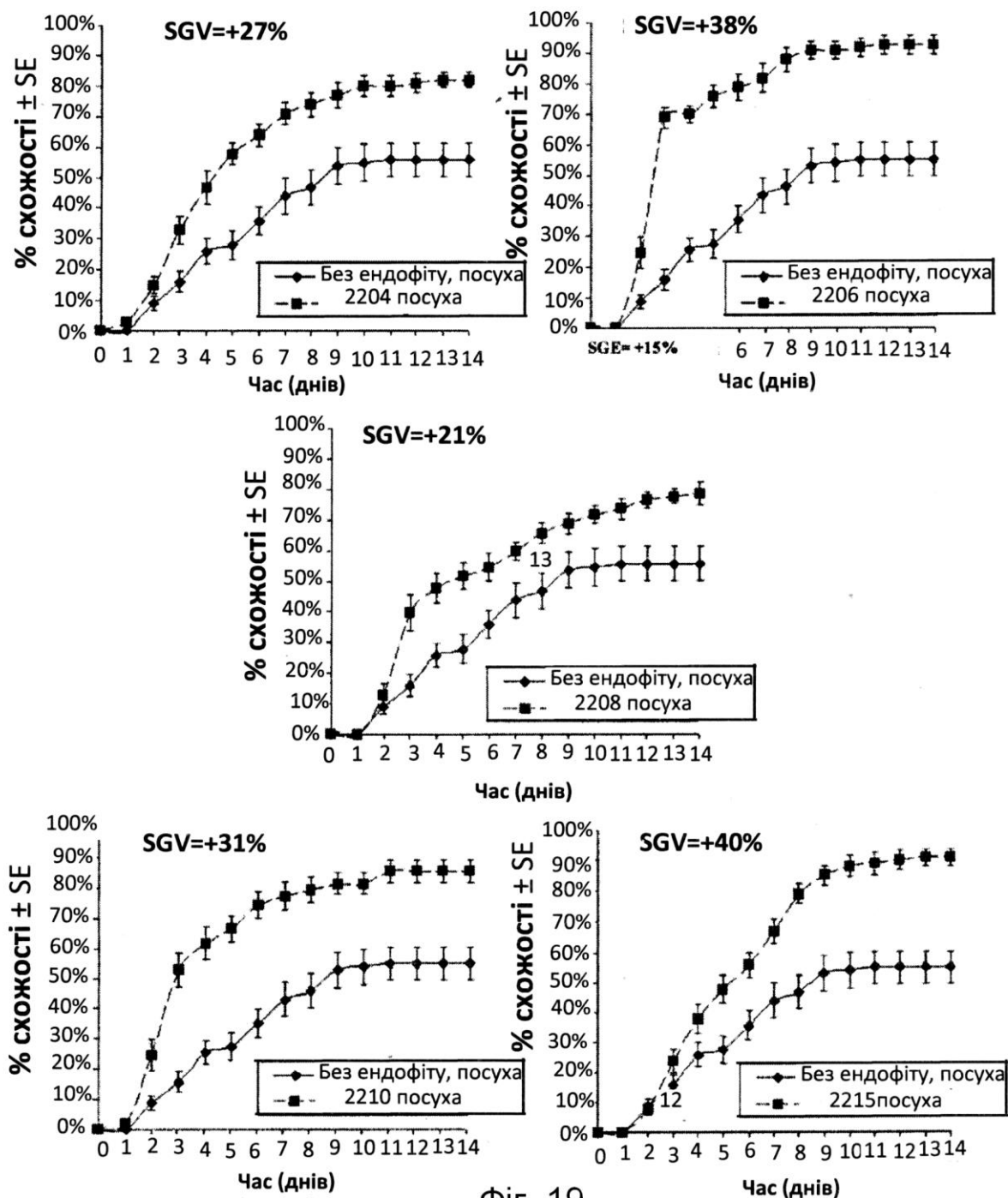
Ендوفіти
Фіг. 16



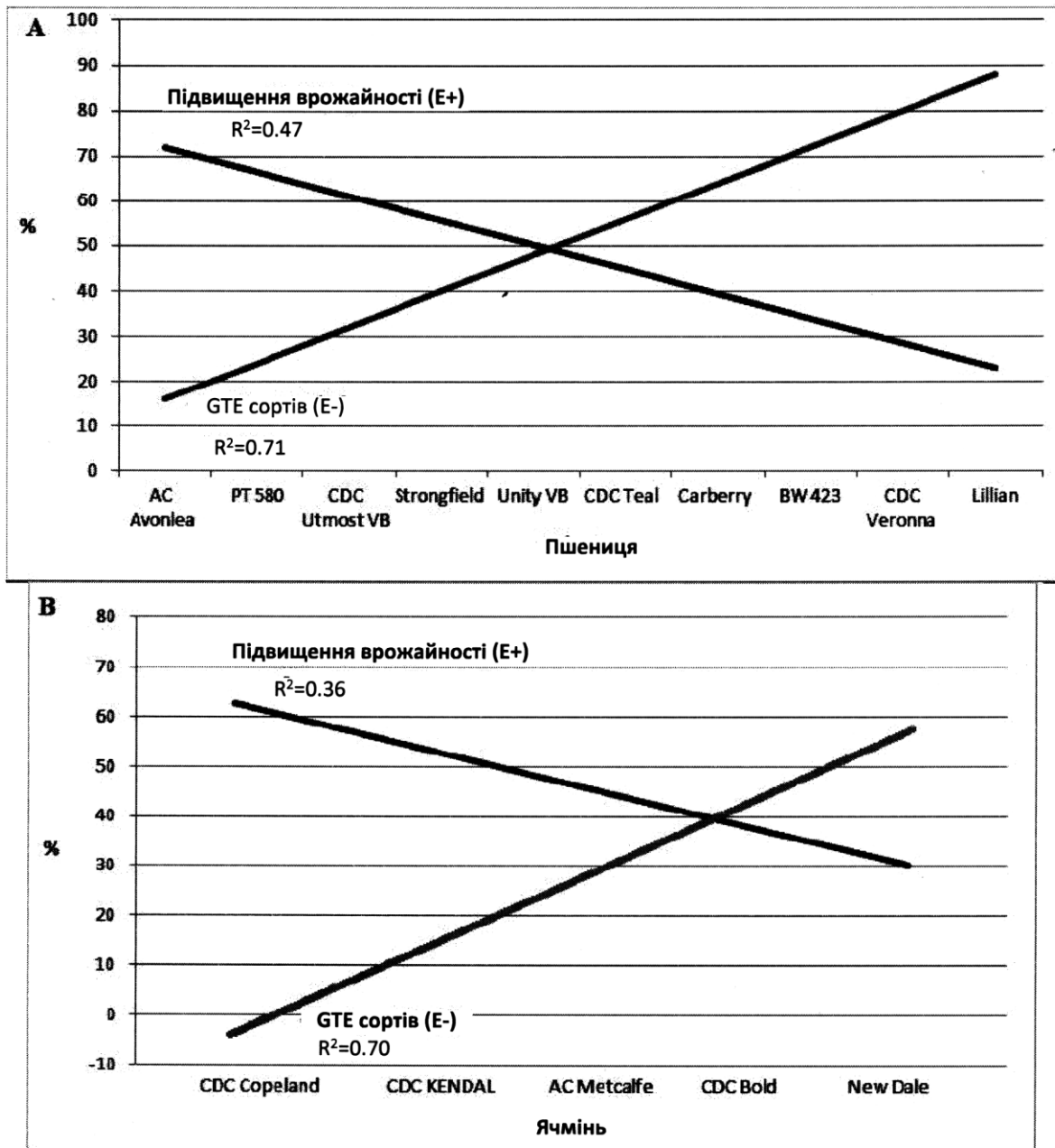
Фіг. 17



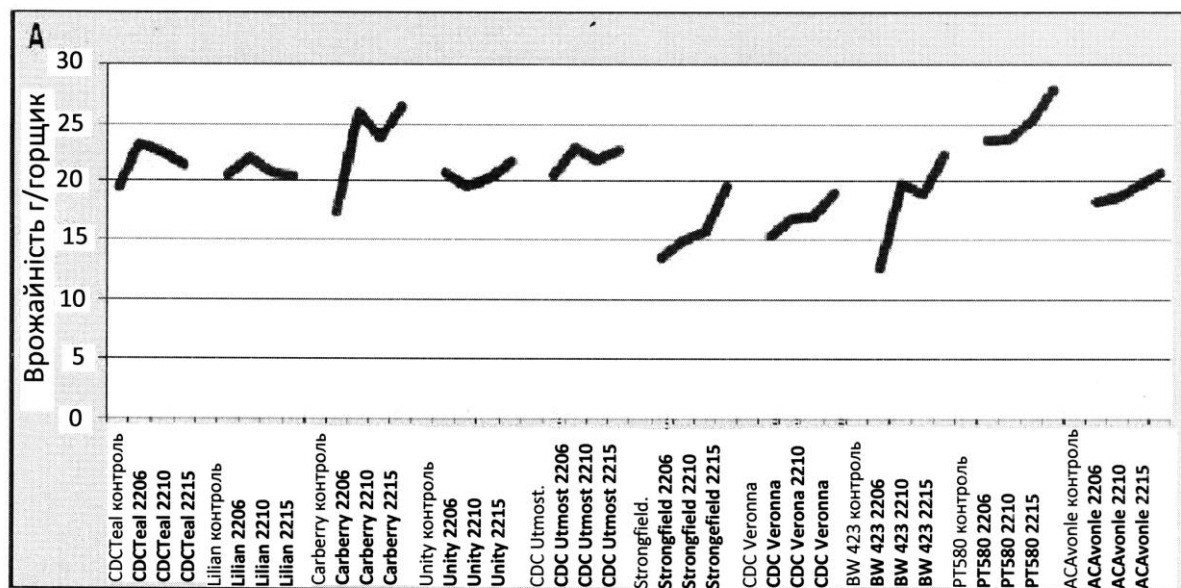
Фіг. 18



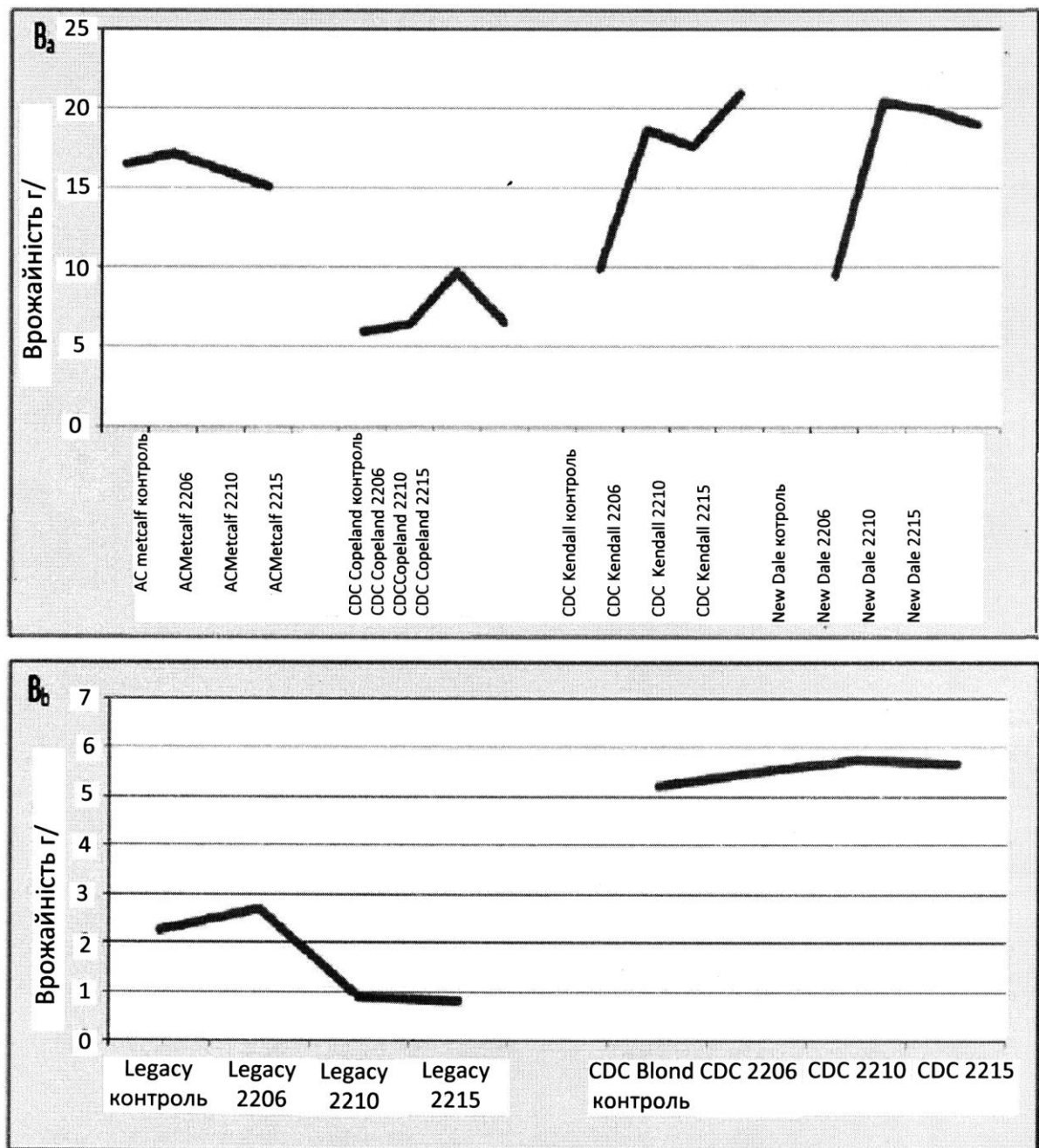
Фіг. 19



Фіг. 20



Фіг. 21а



Фіг. 21в

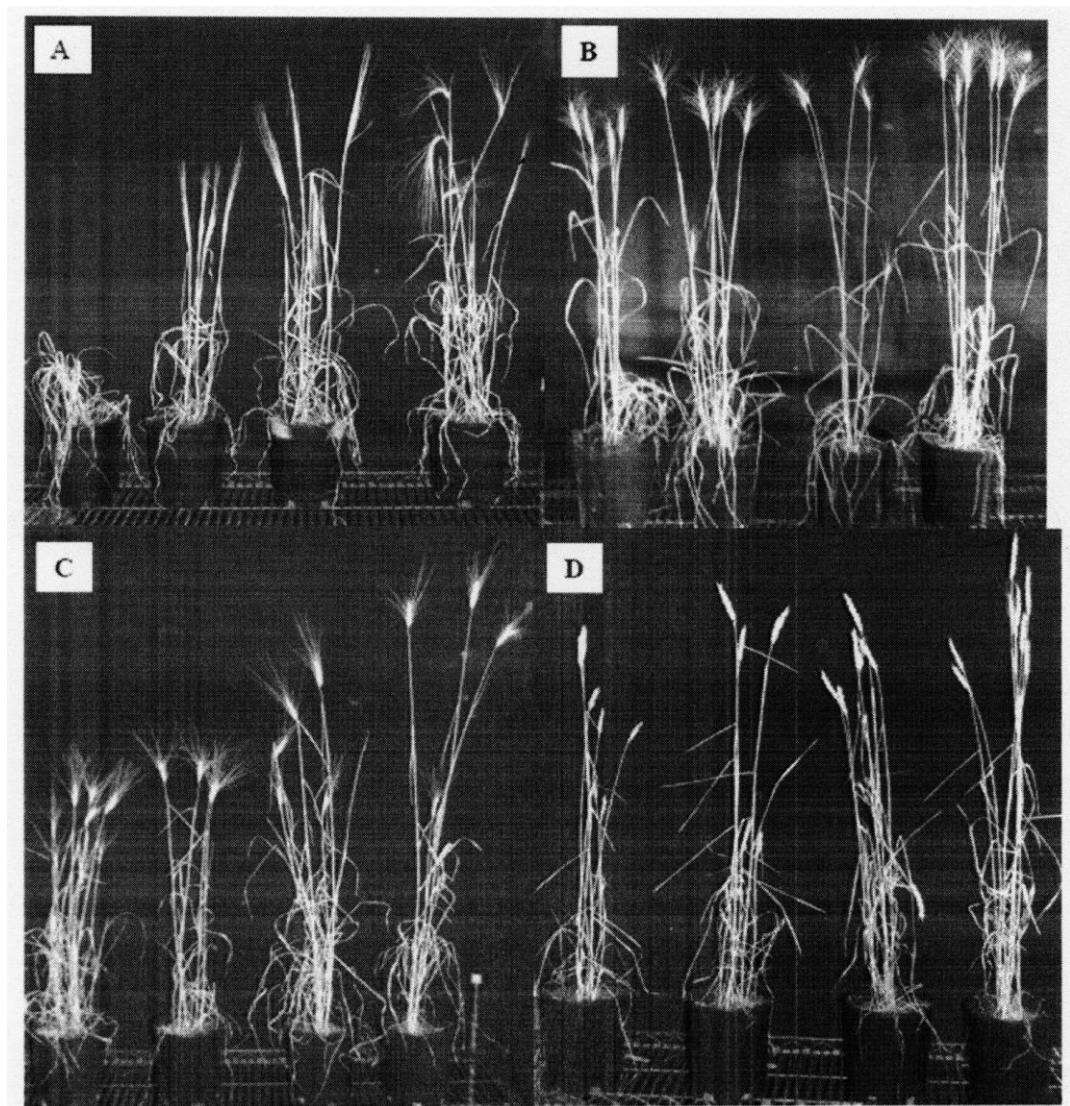
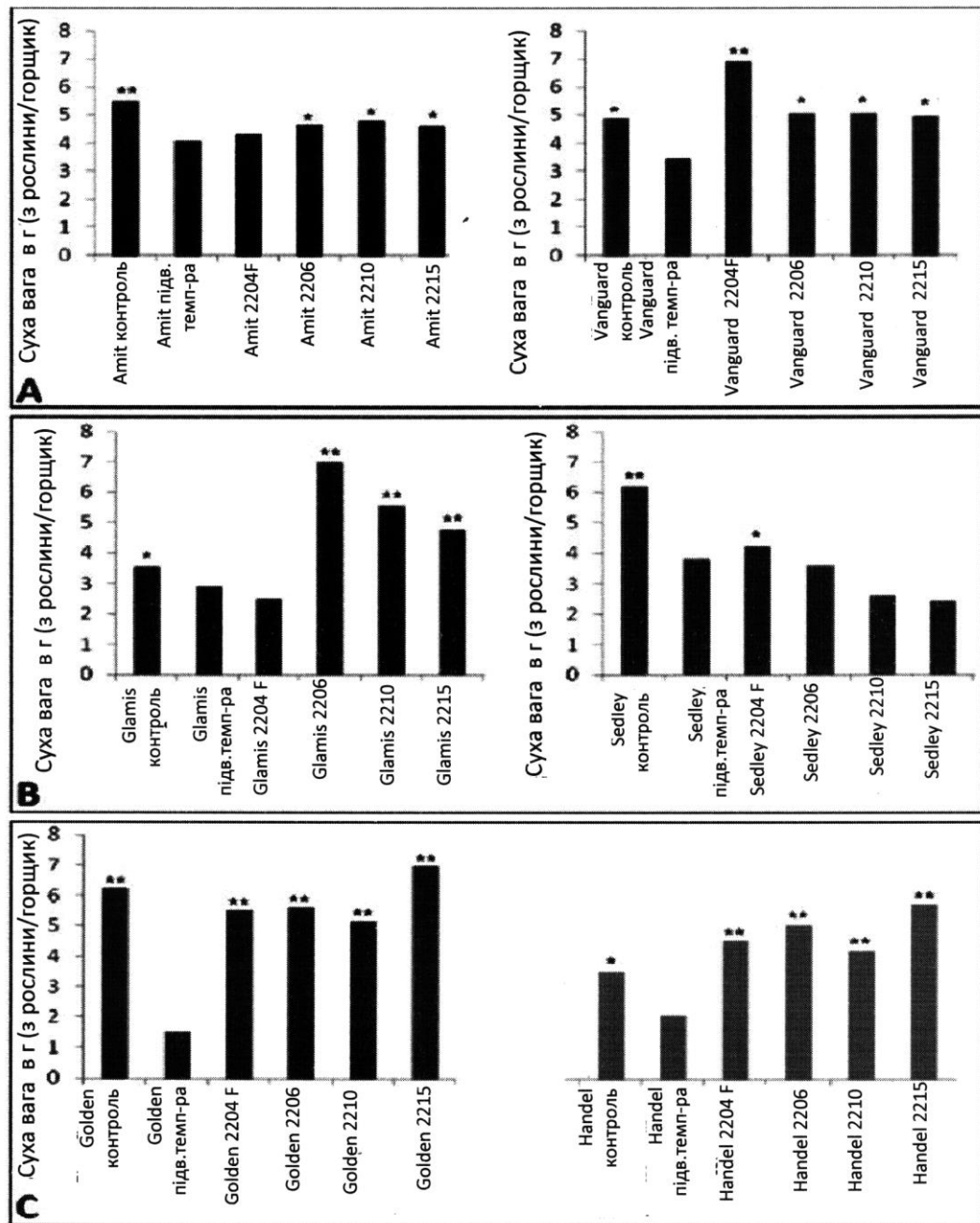
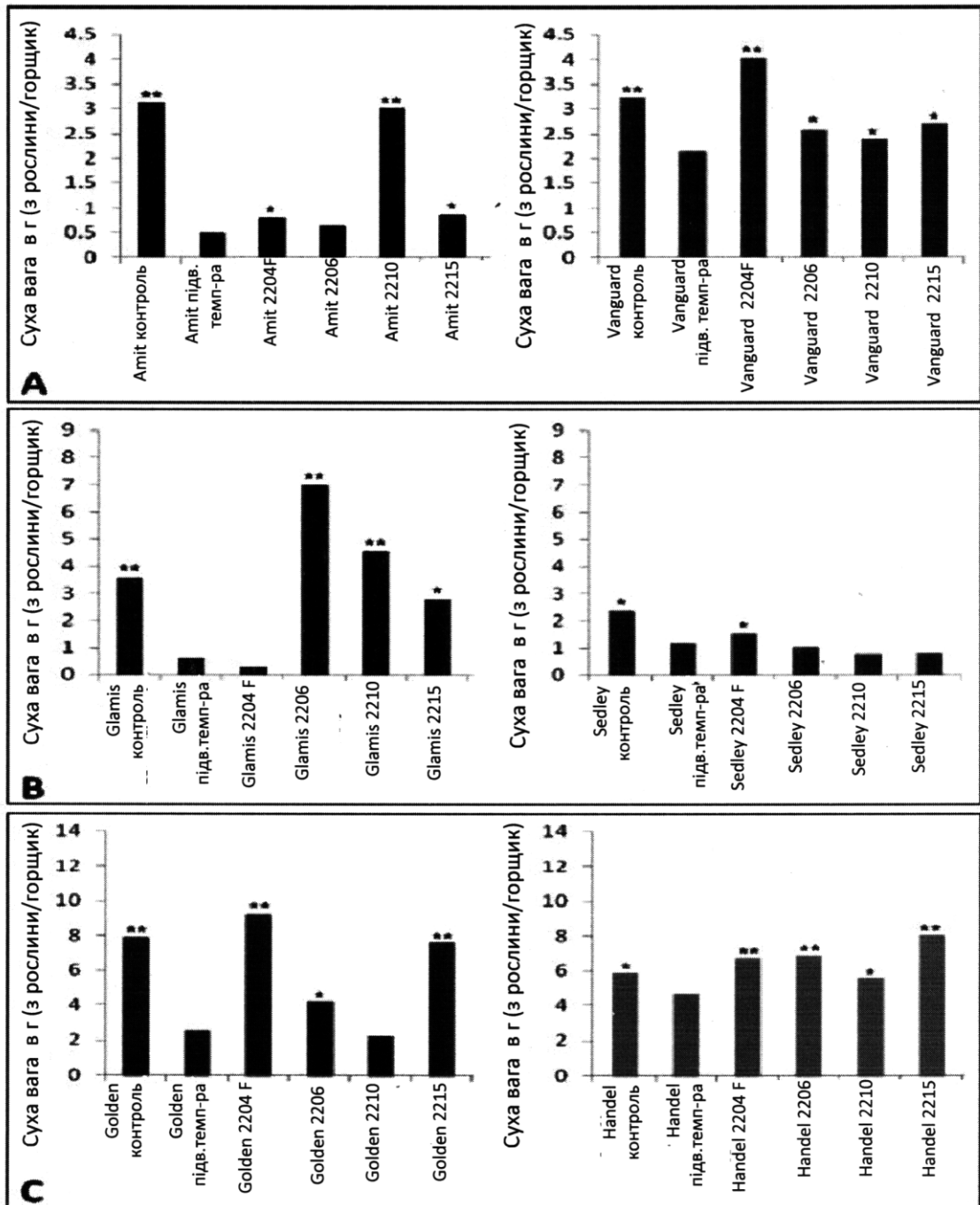


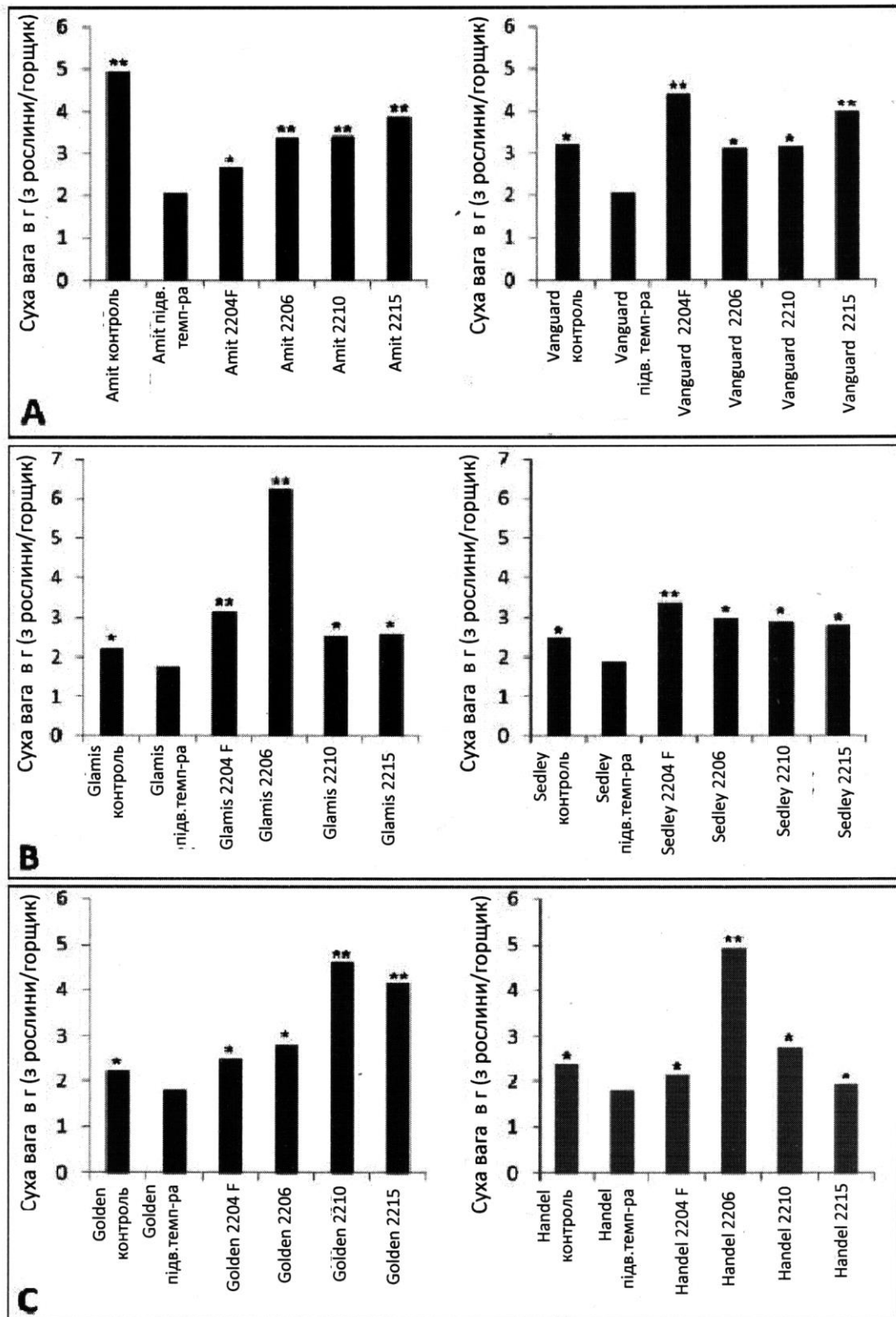
Fig. 22



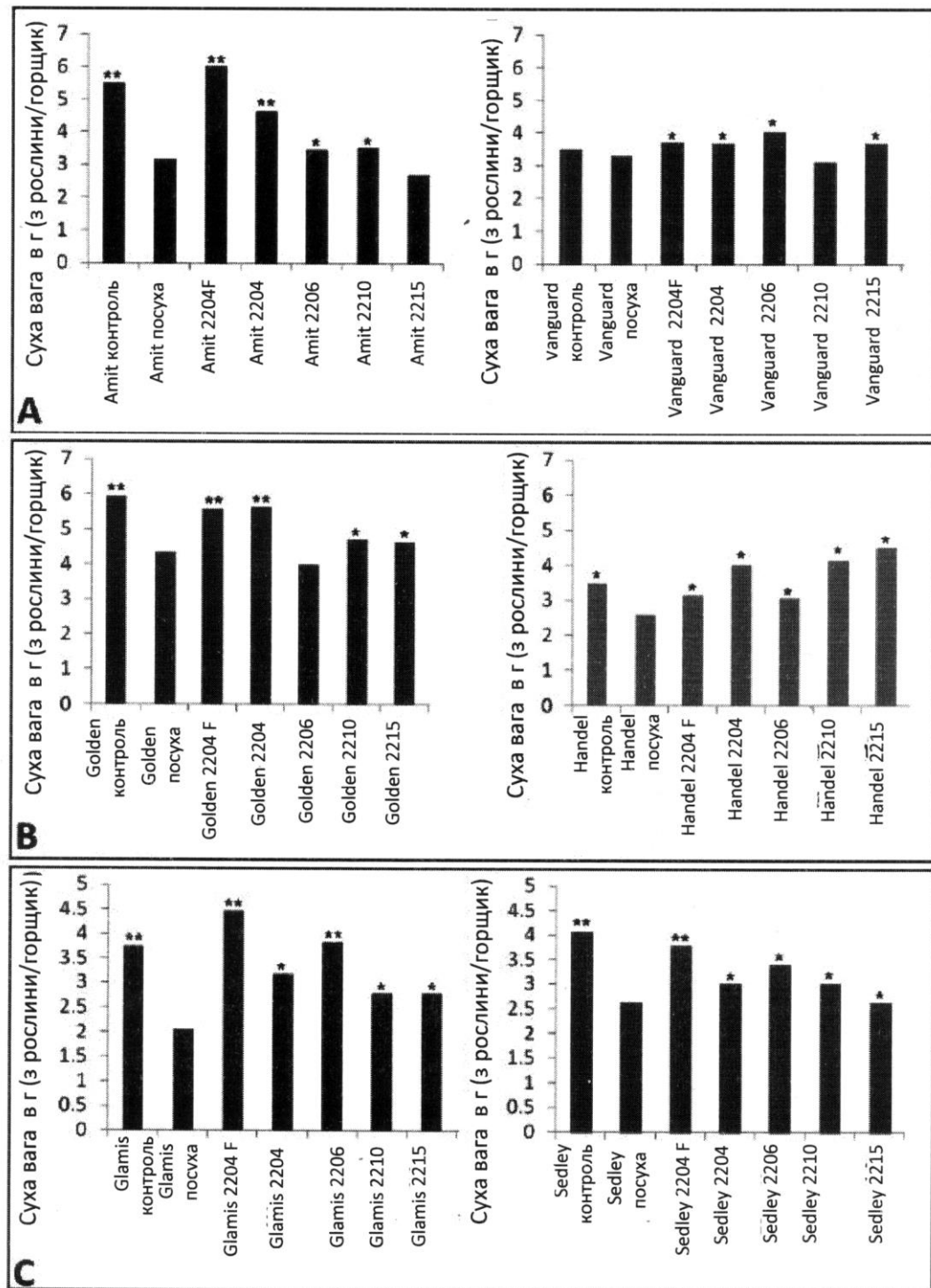
Фіг. 23



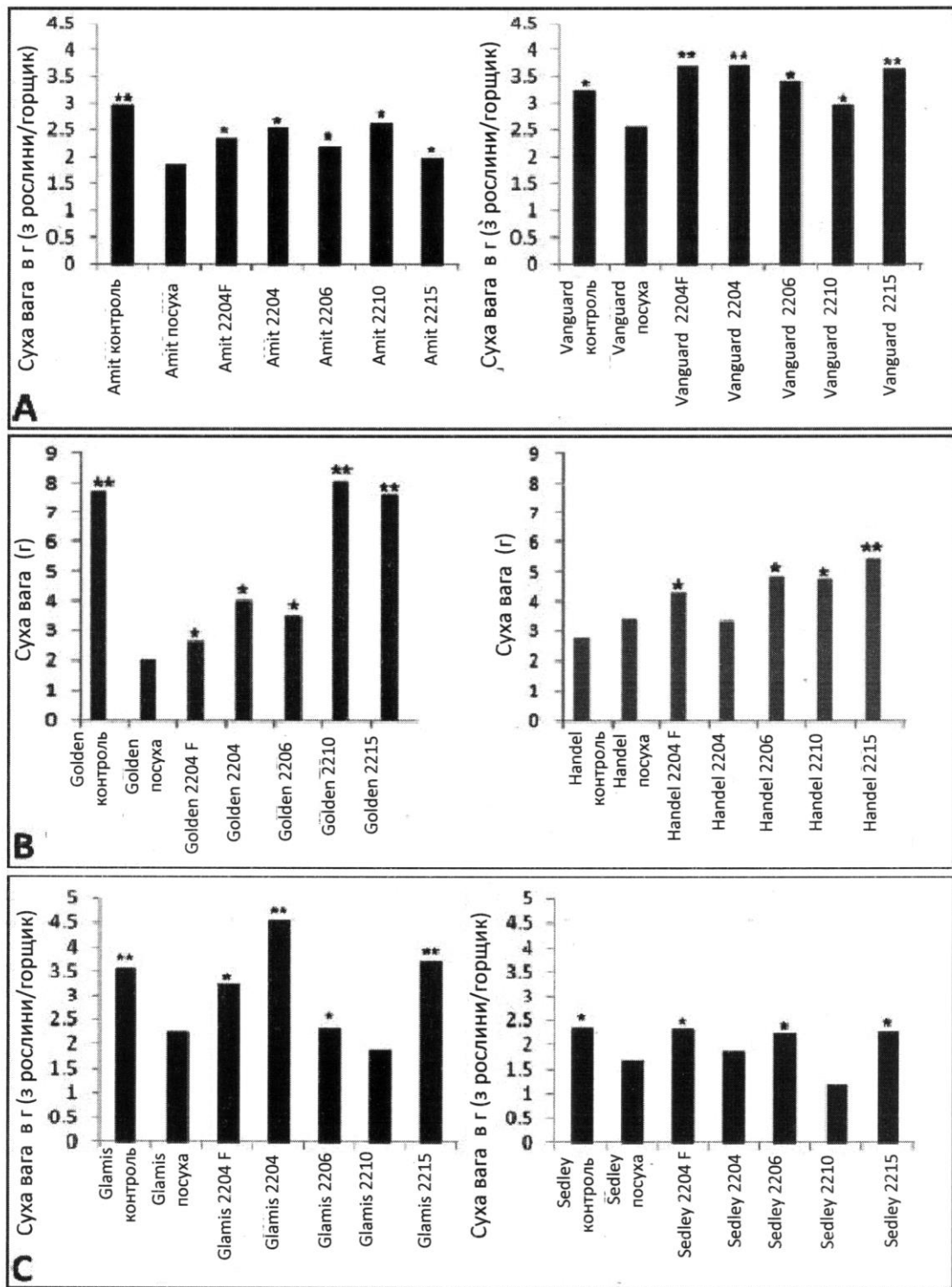
Фіг. 24



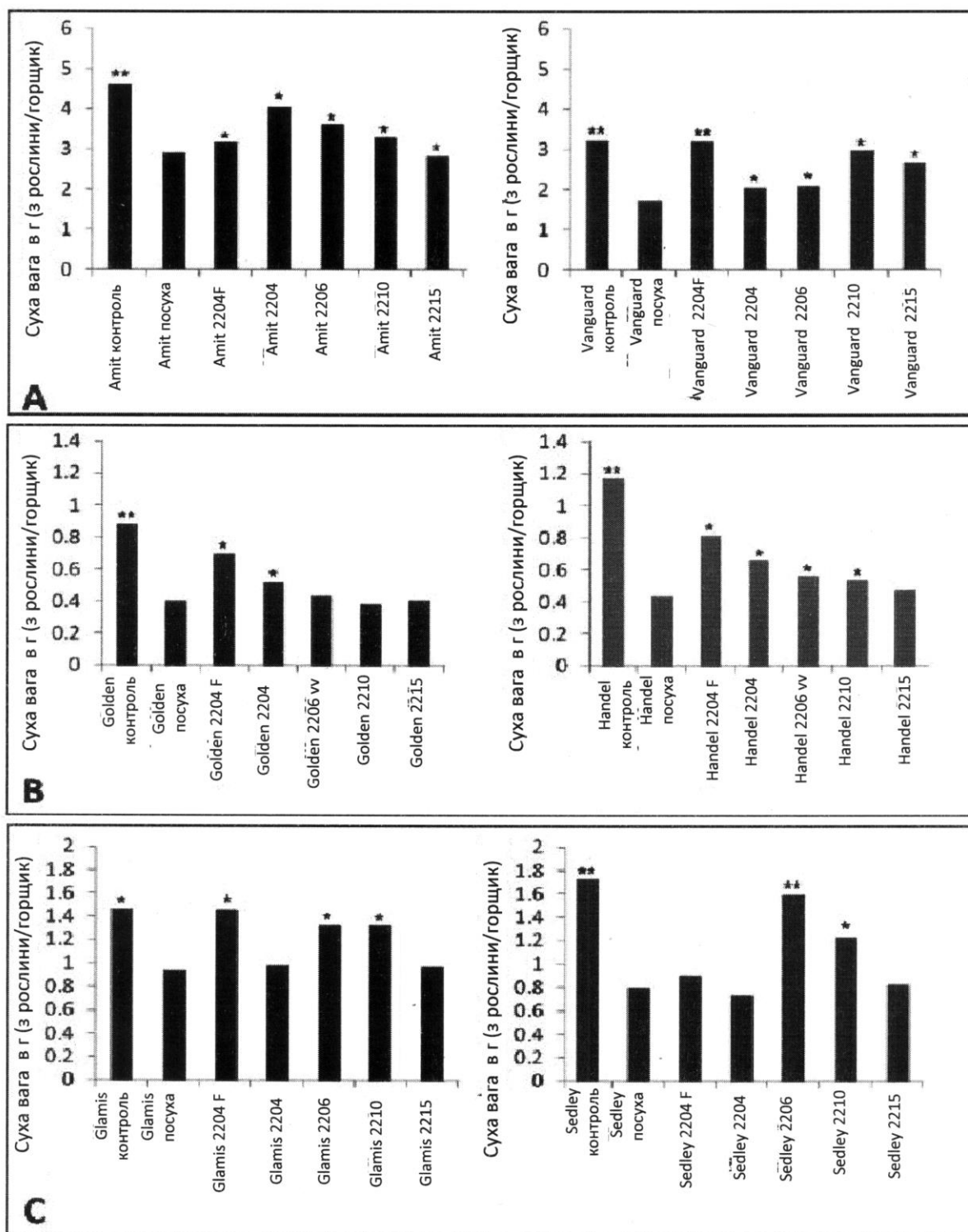
Фіг. 25



Фіг. 26



Фіг. 27



Фіг. 28

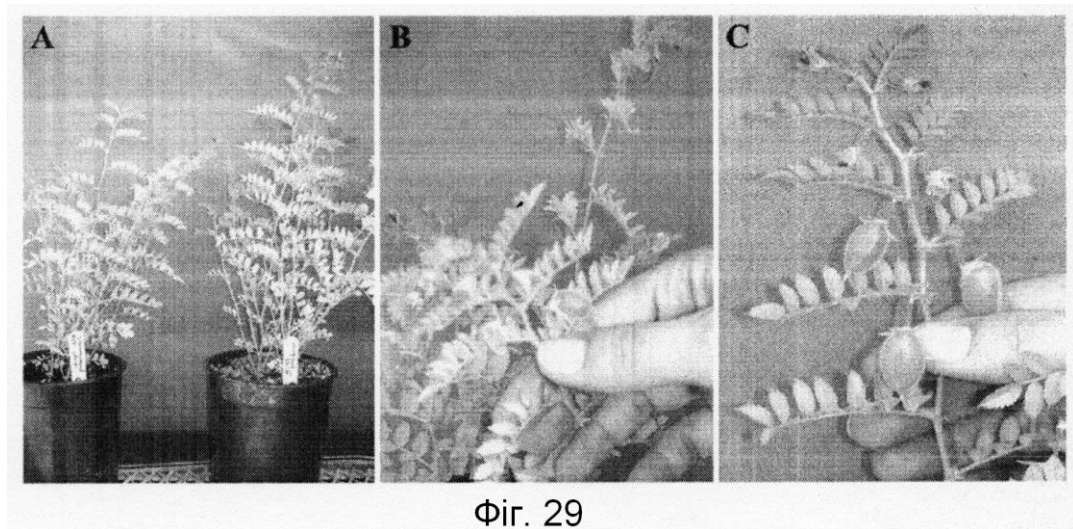


Fig. 29

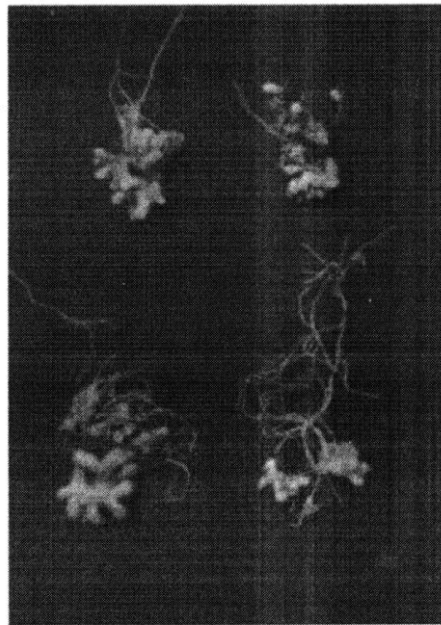
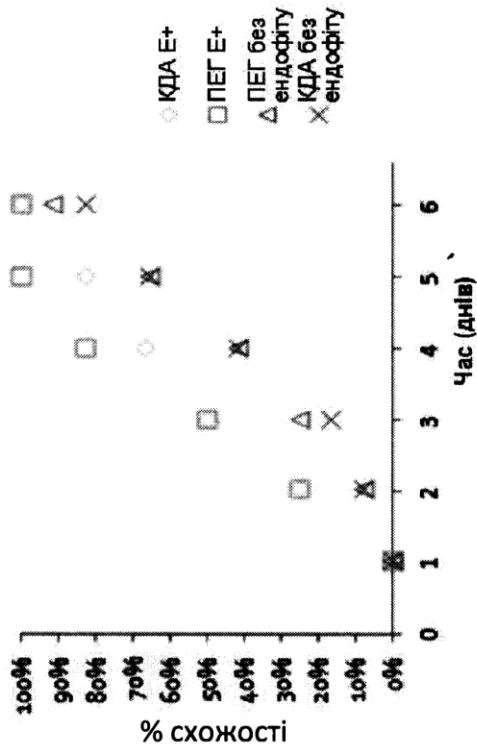
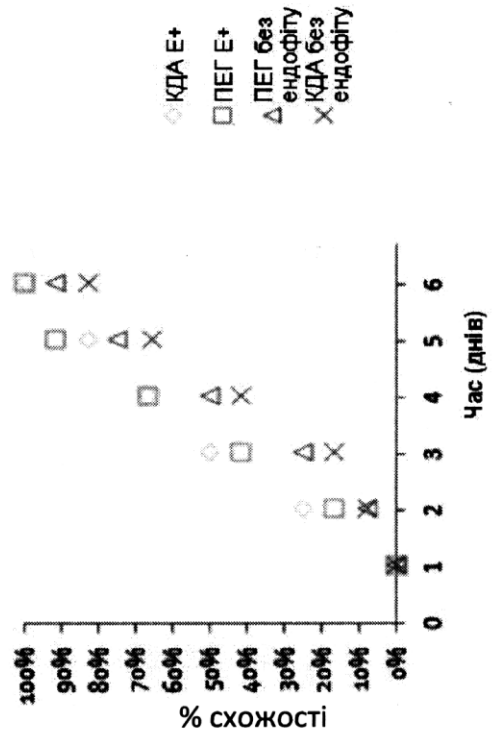


Fig. 30

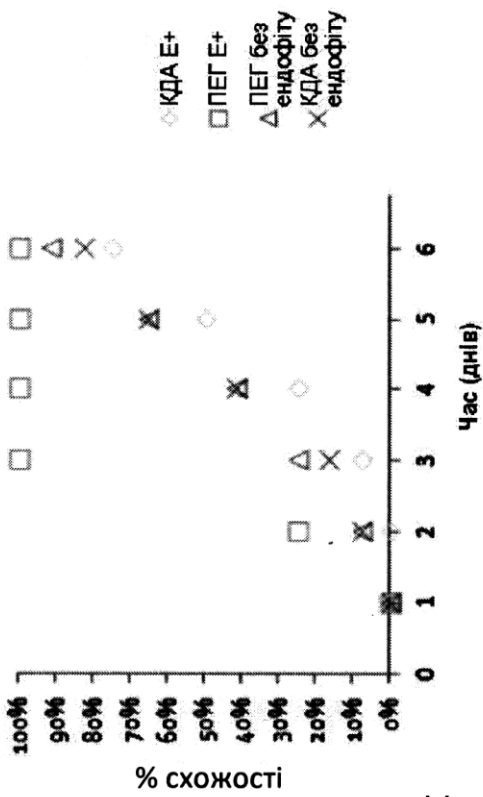
Енергія проростання КДА + ПЕГ SMAD 2215



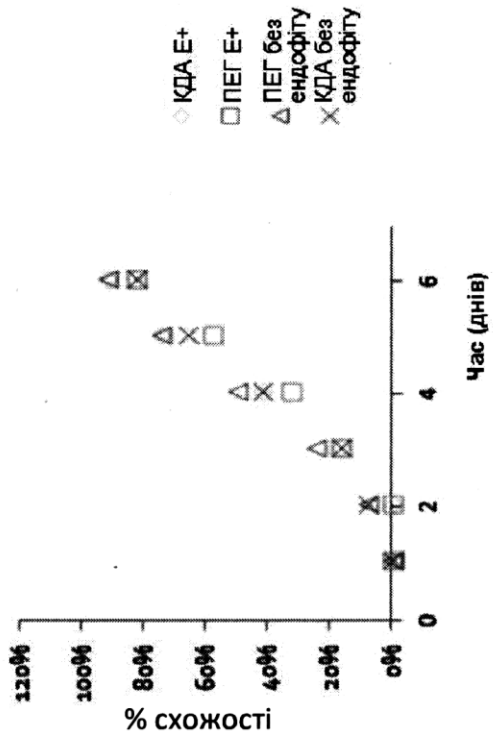
Енергія проростання КДА + Підвищена температура SMDC 2215



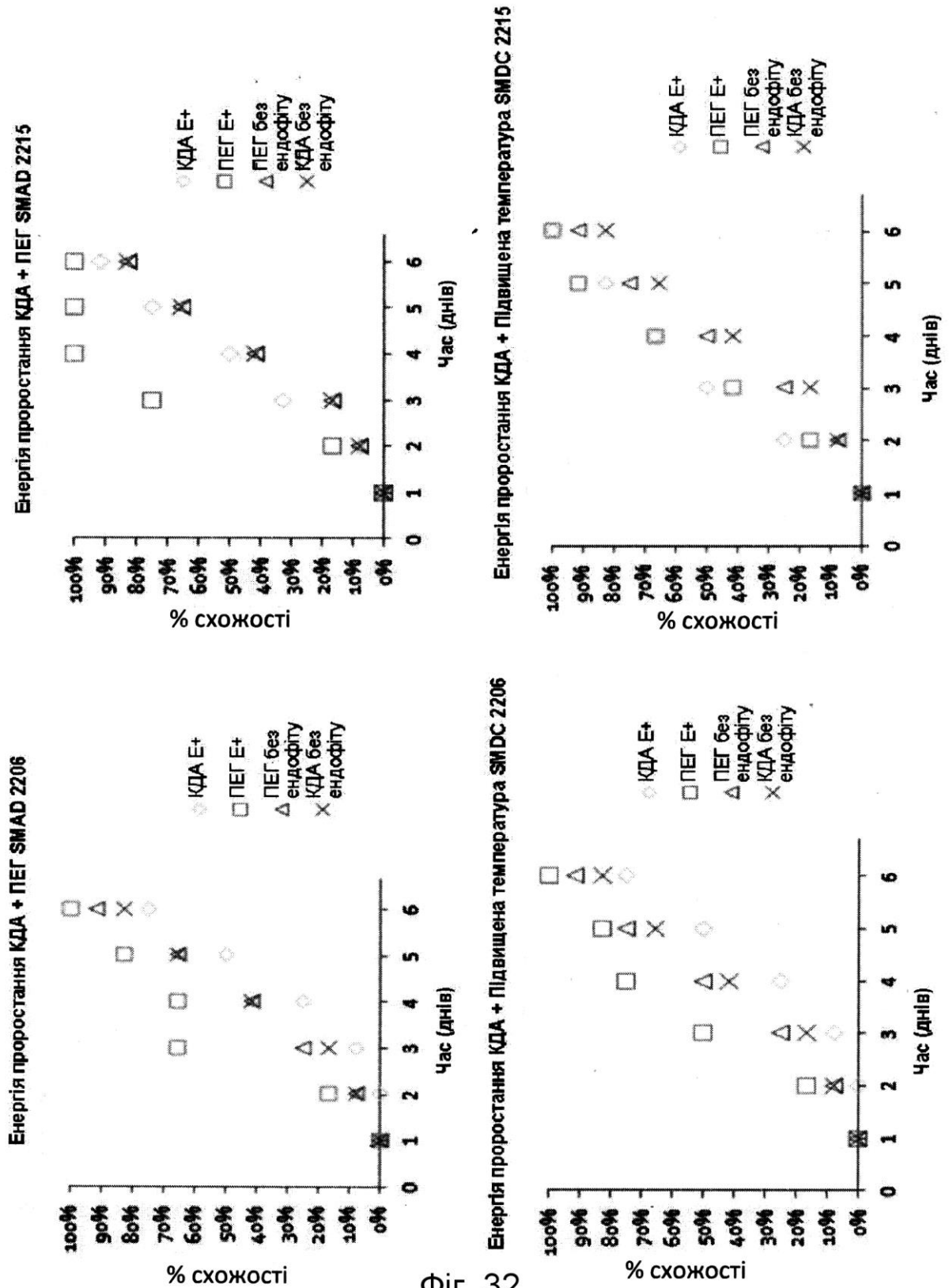
Енергія проростання КДА + ПЕГ SMAD 2206



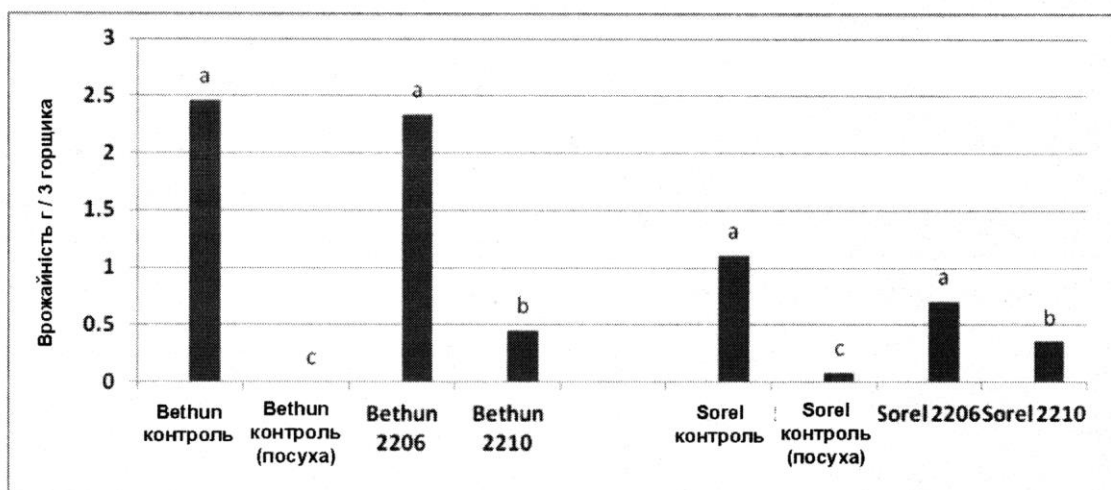
Енергія проростання КДА + Підвищена температура SMDC 2206



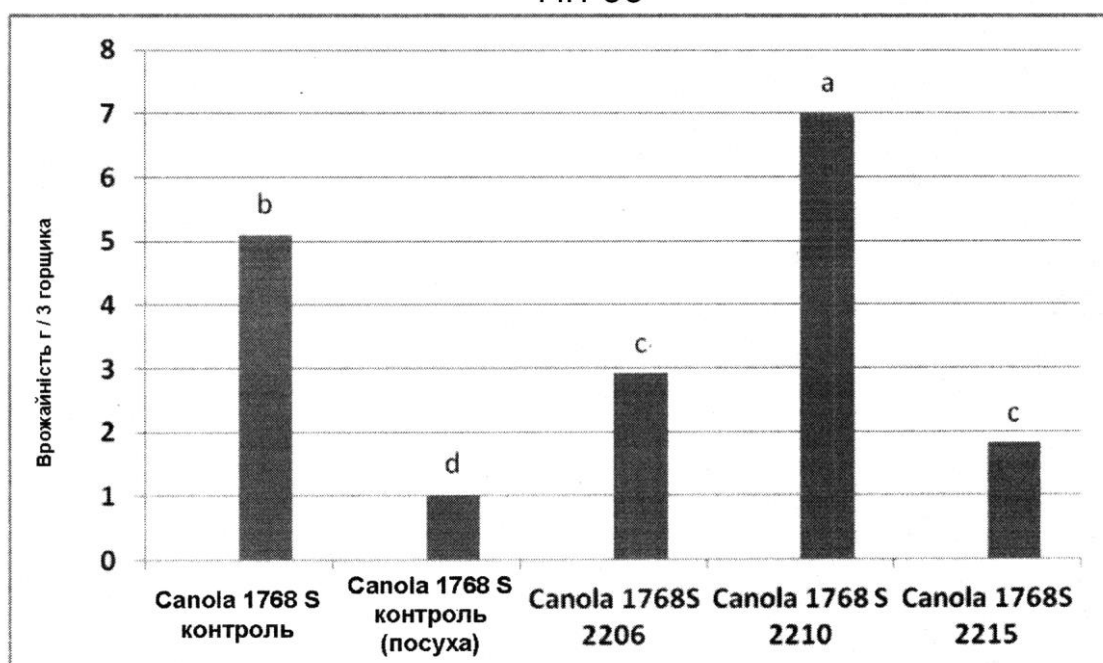
Фіг. 31



Фіг. 32



Фіг. 33



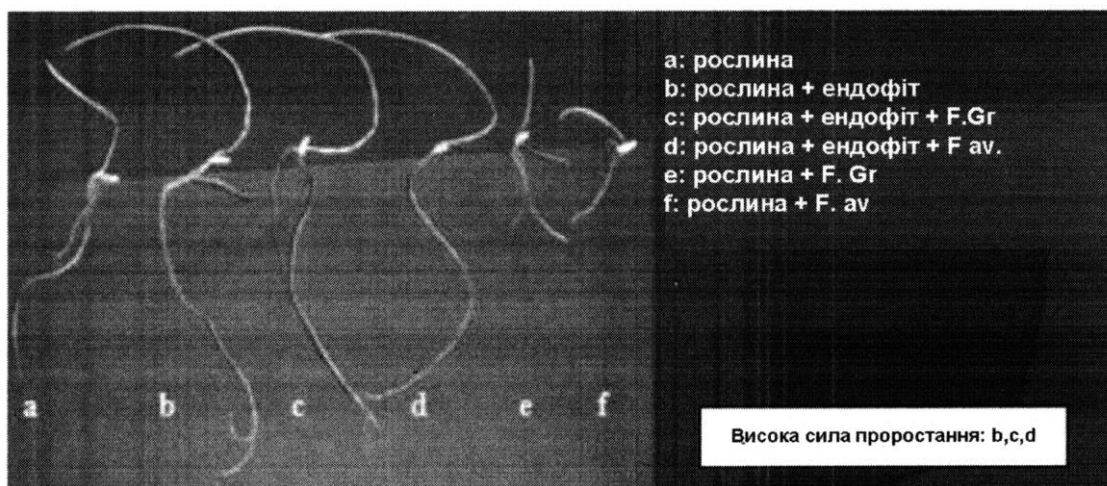
Фіг. 34



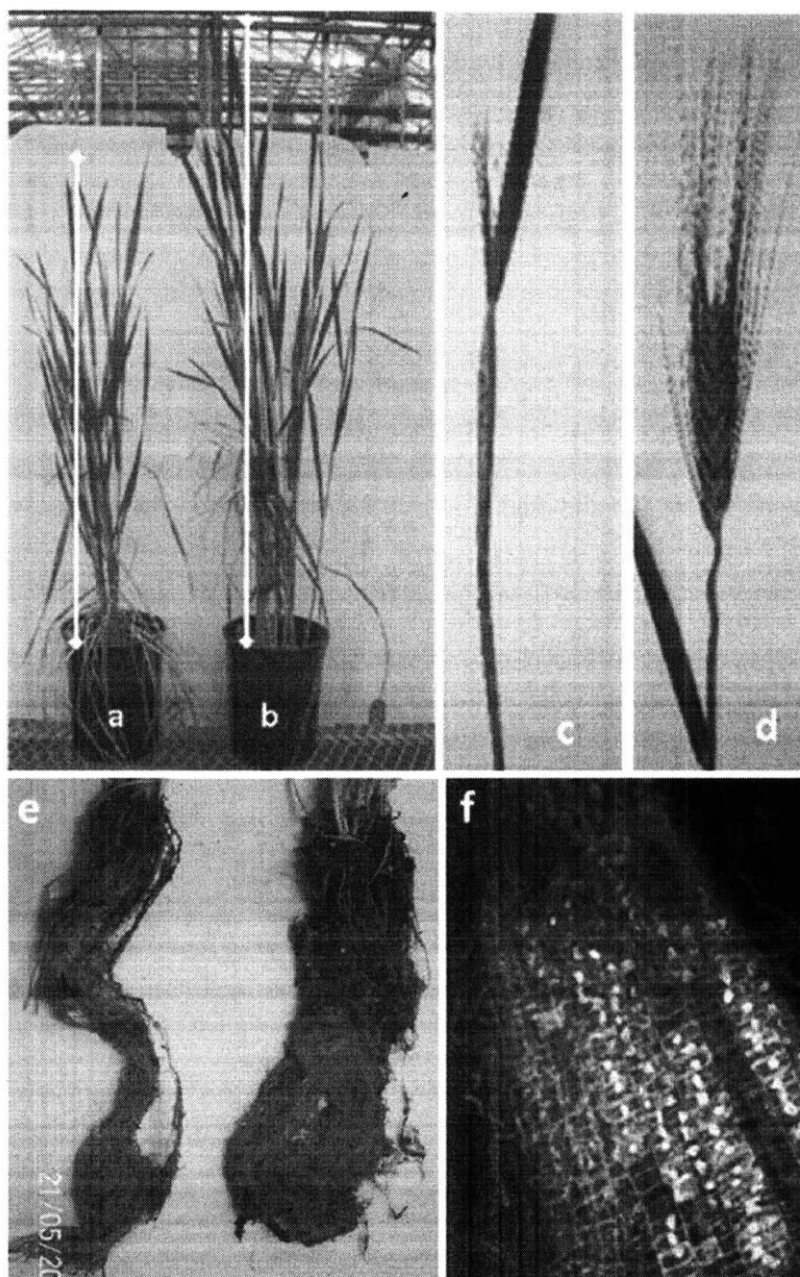
Фіг. 35



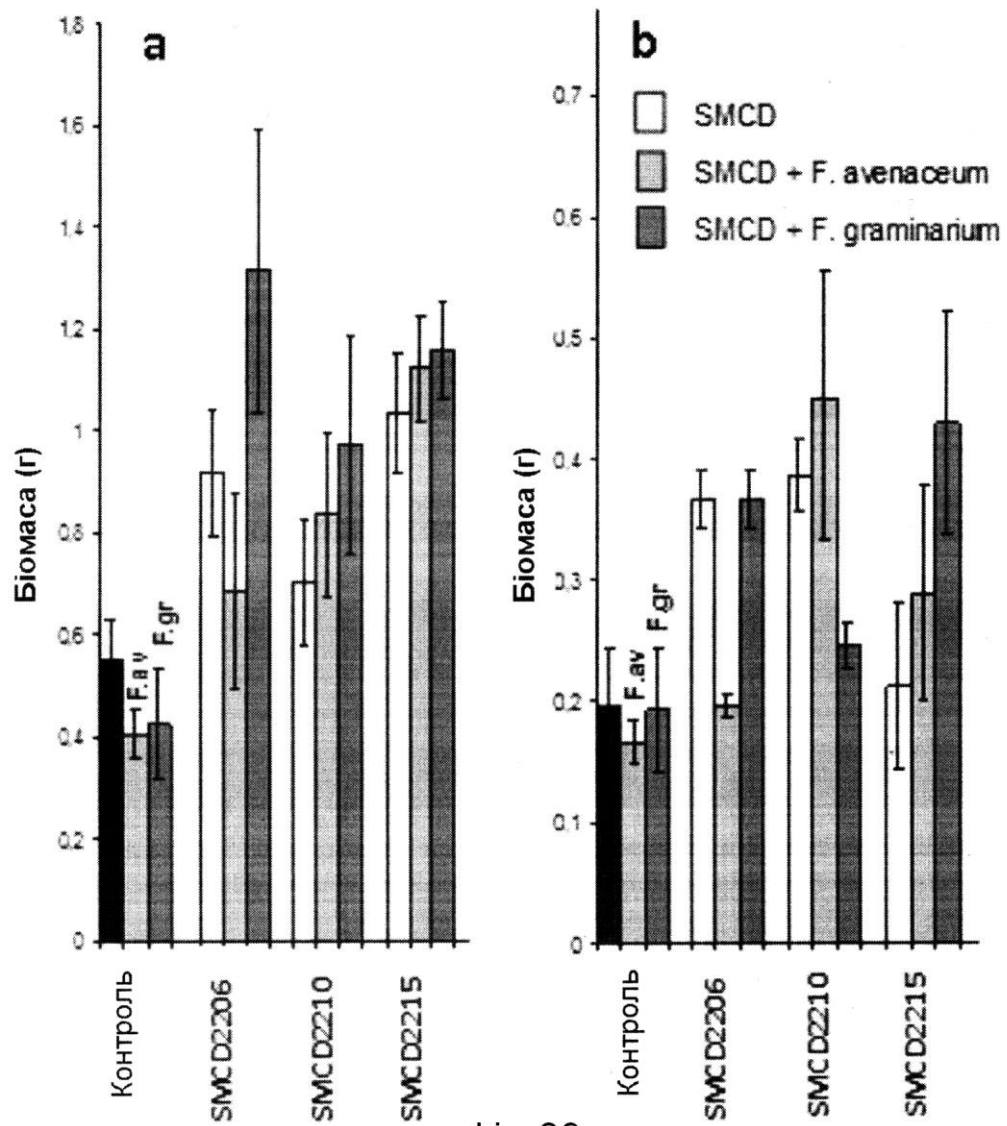
Фіг. 36



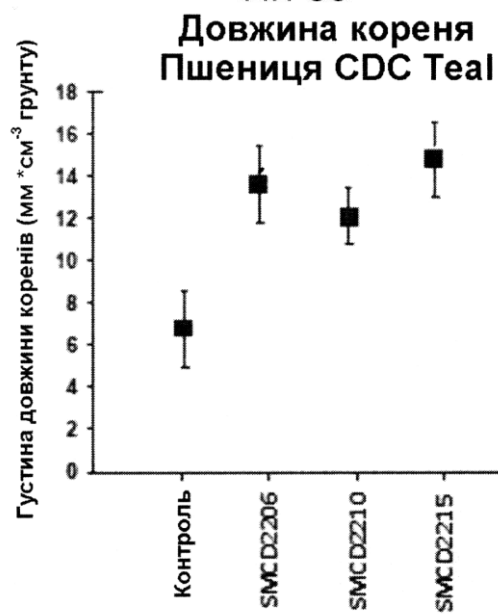
Фіг. 37



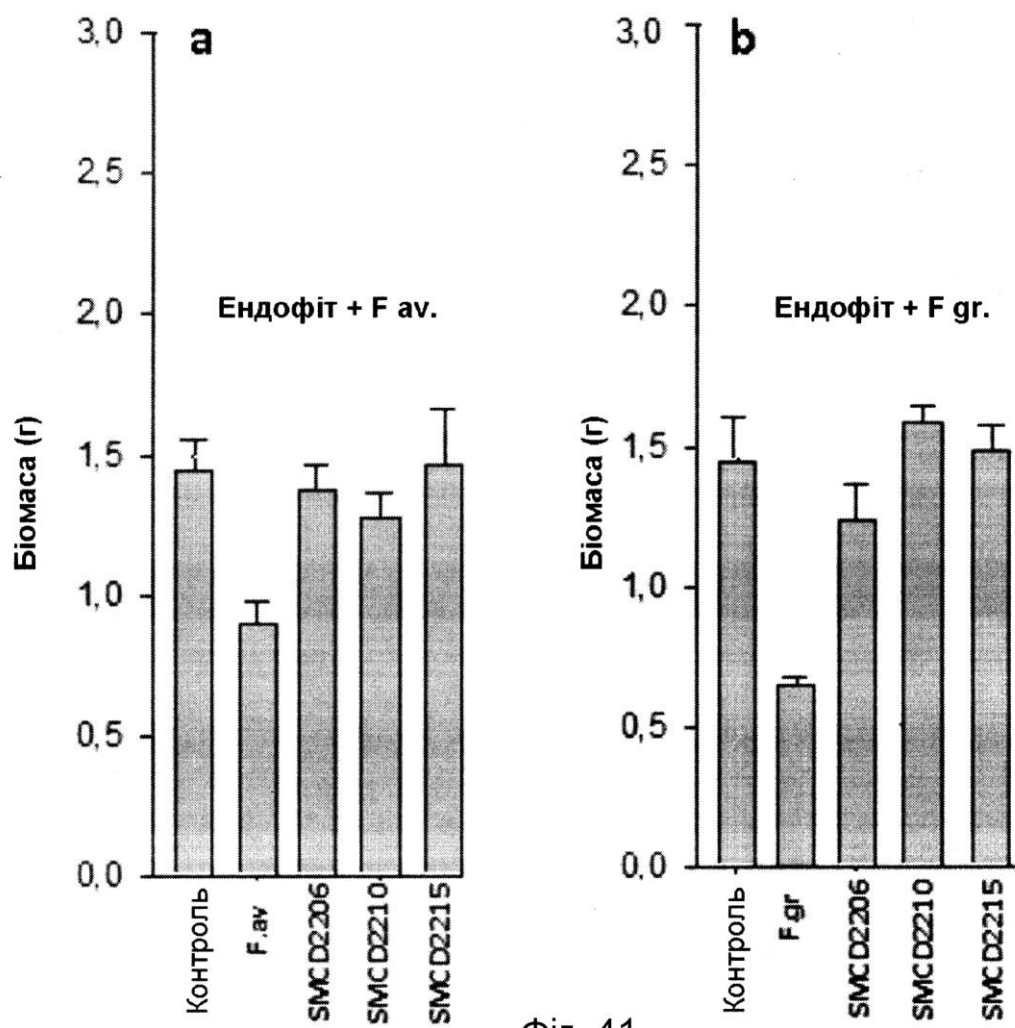
Фіг. 38



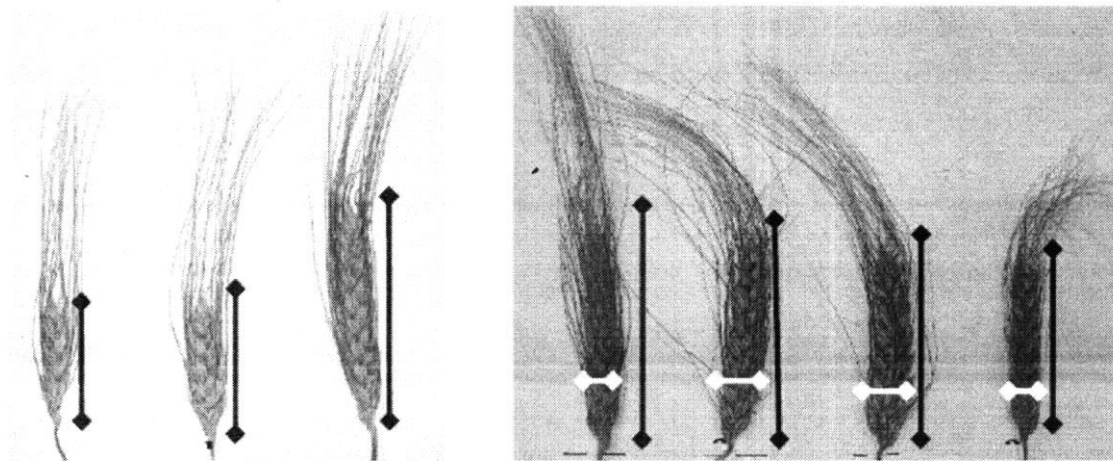
Фіг. 39



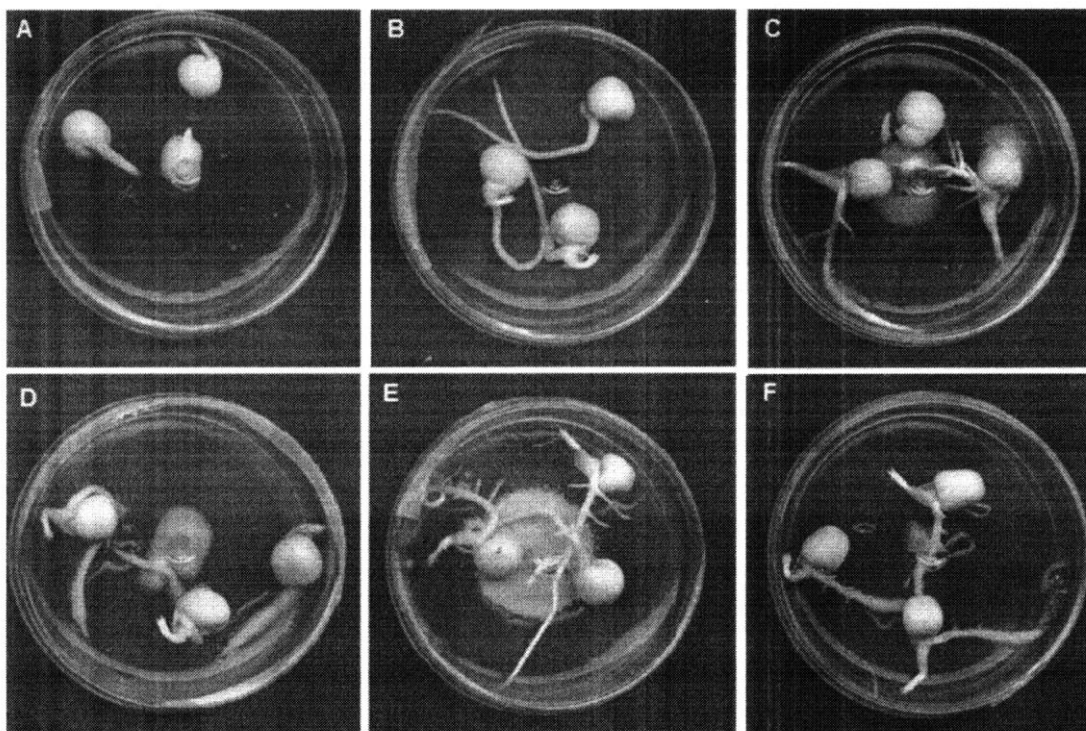
Фіг. 40



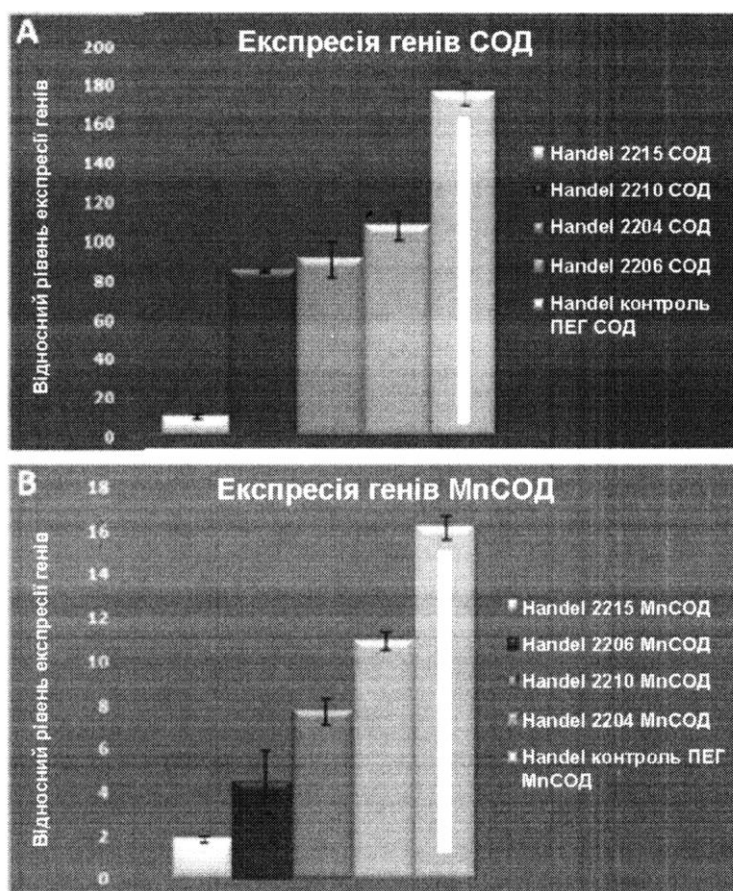
Фиг. 41



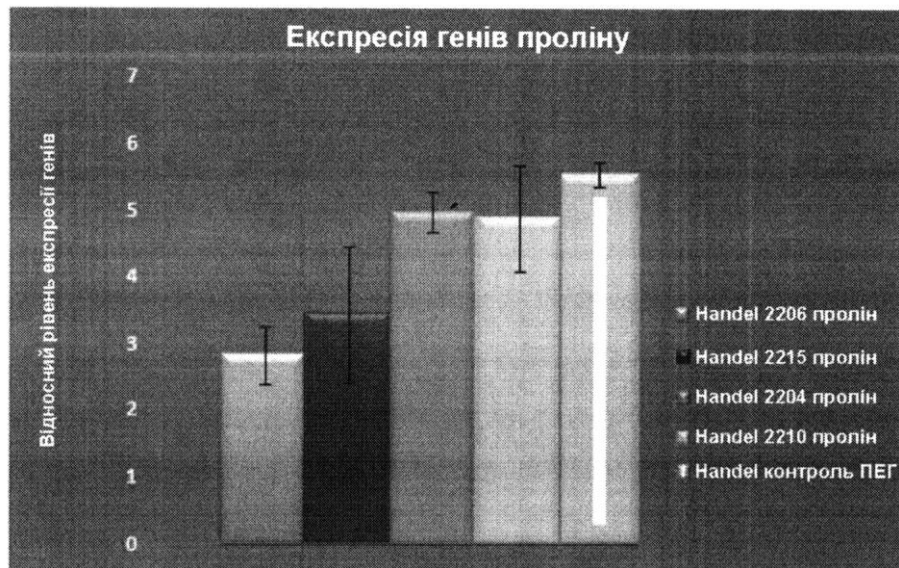
Фиг. 42



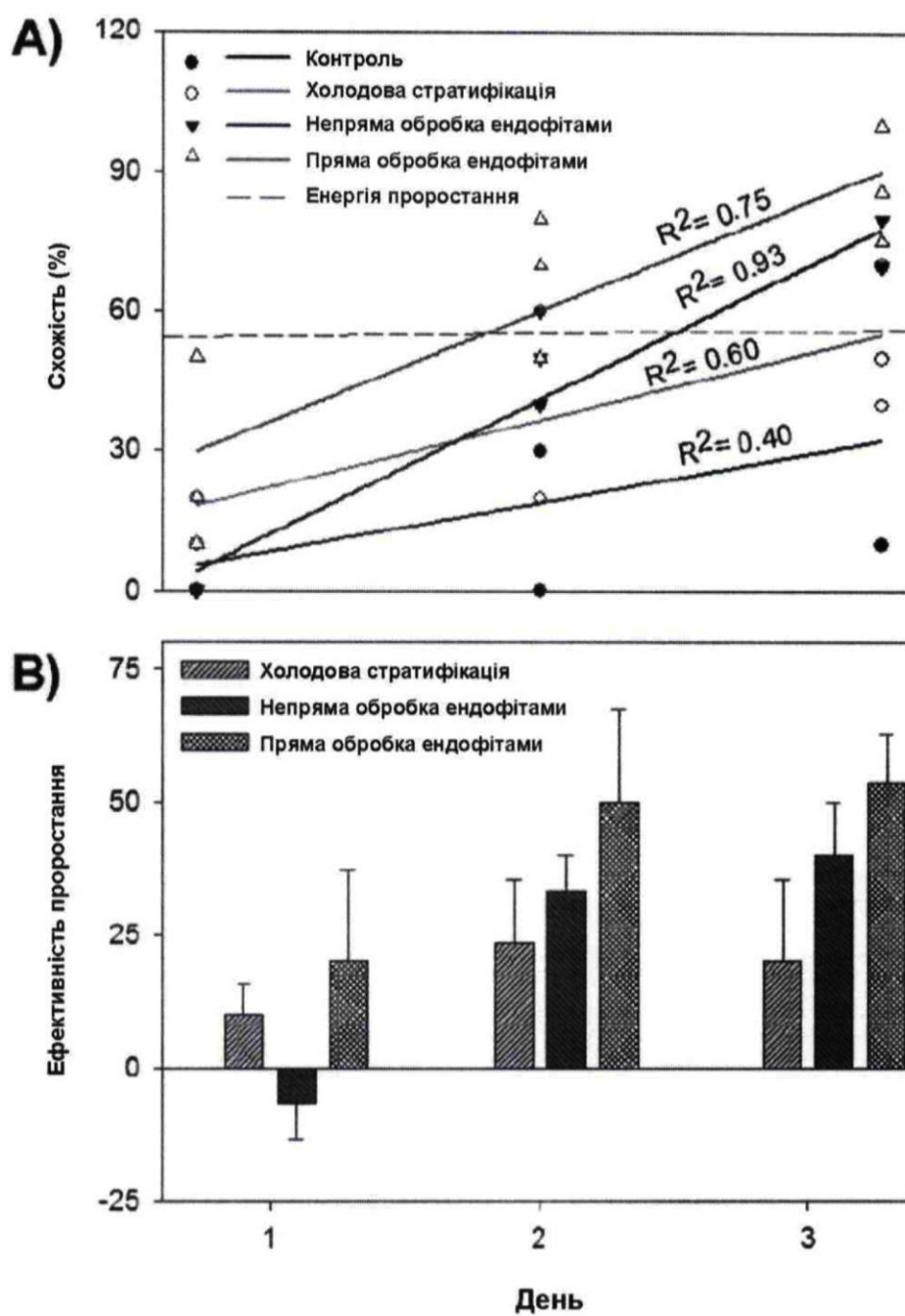
Фіг. 43



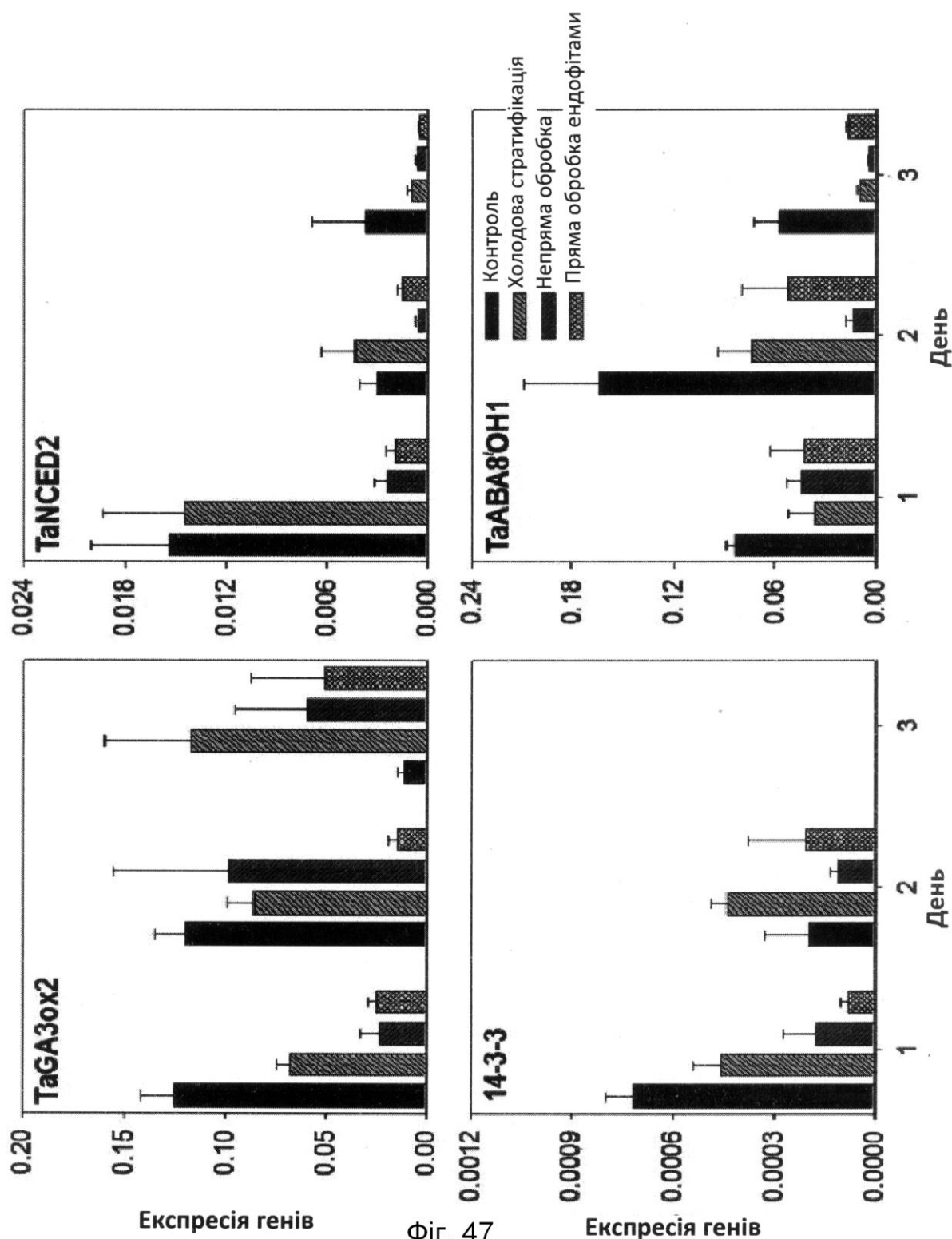
Фіг. 44



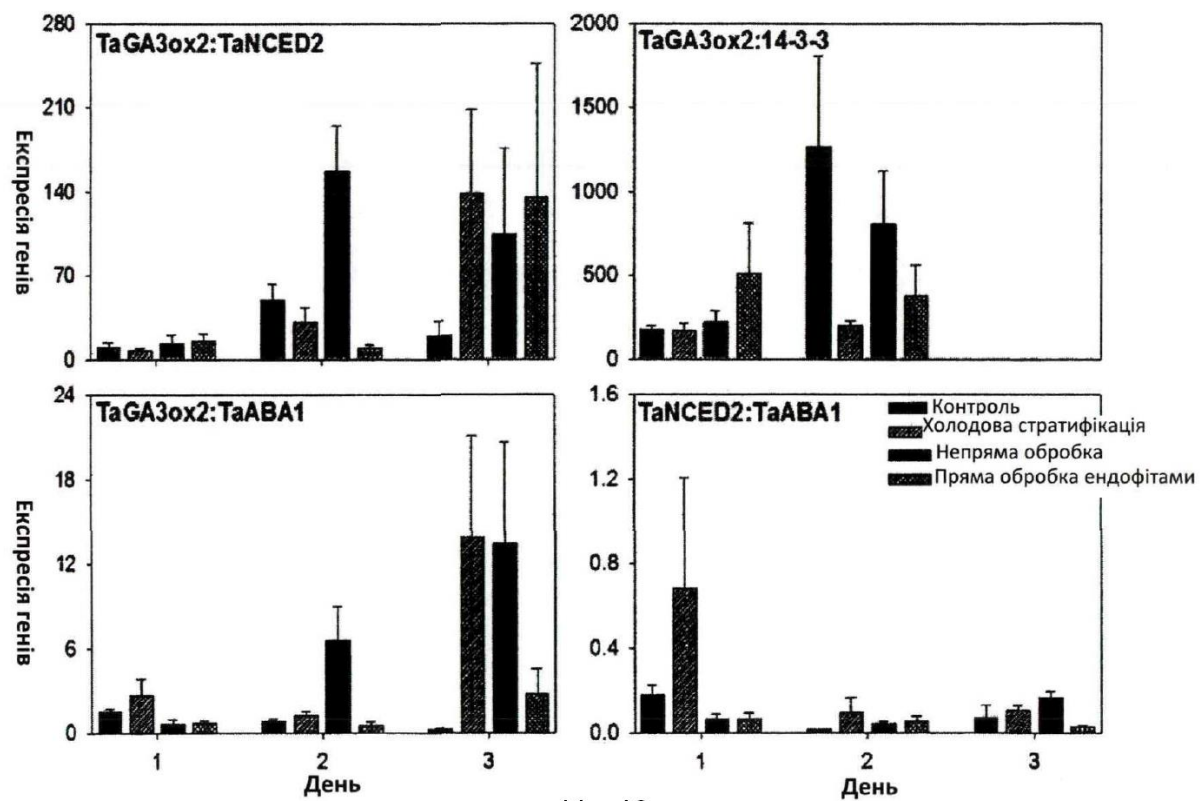
Фіг. 45



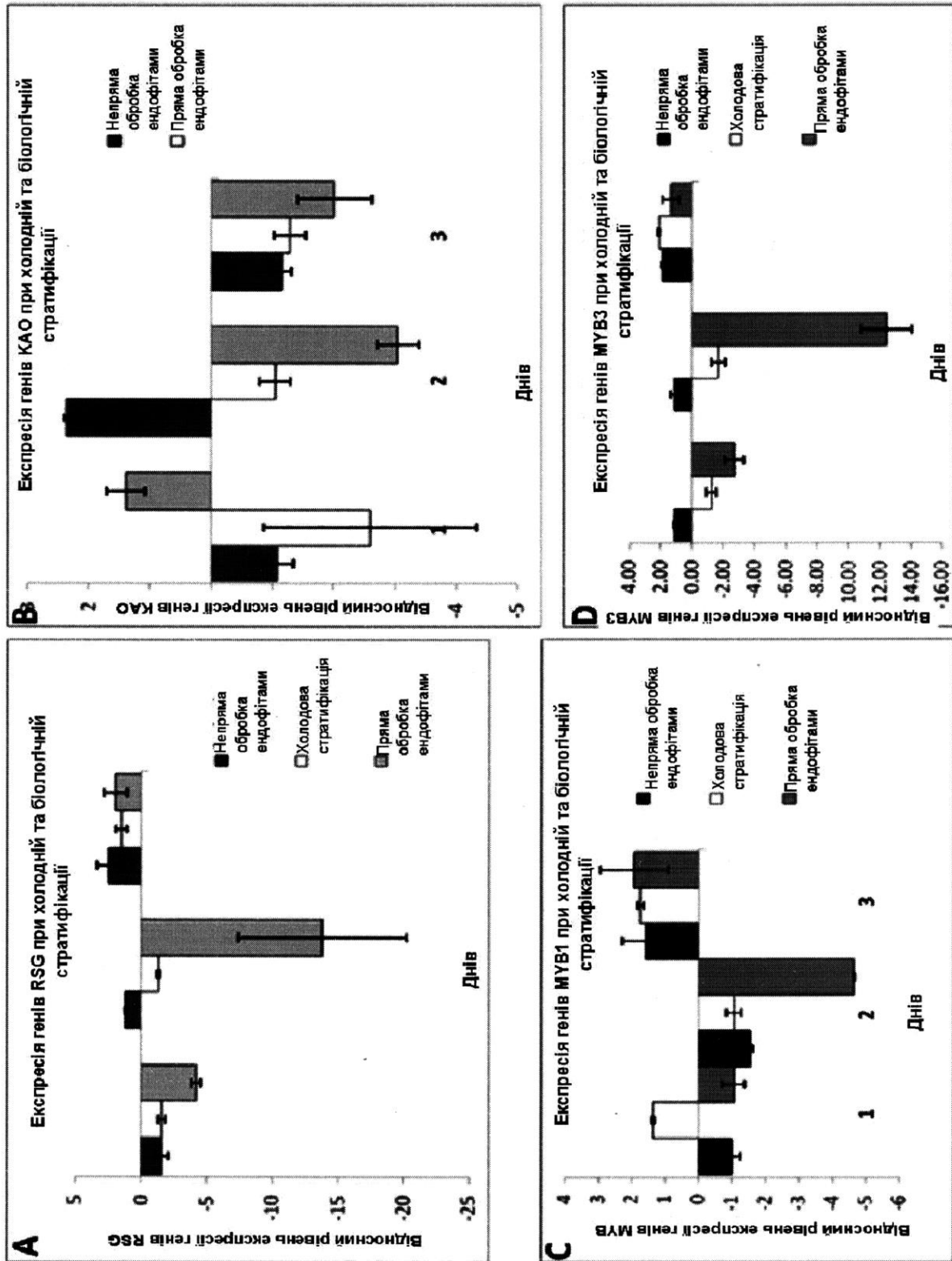
Фіг. 46



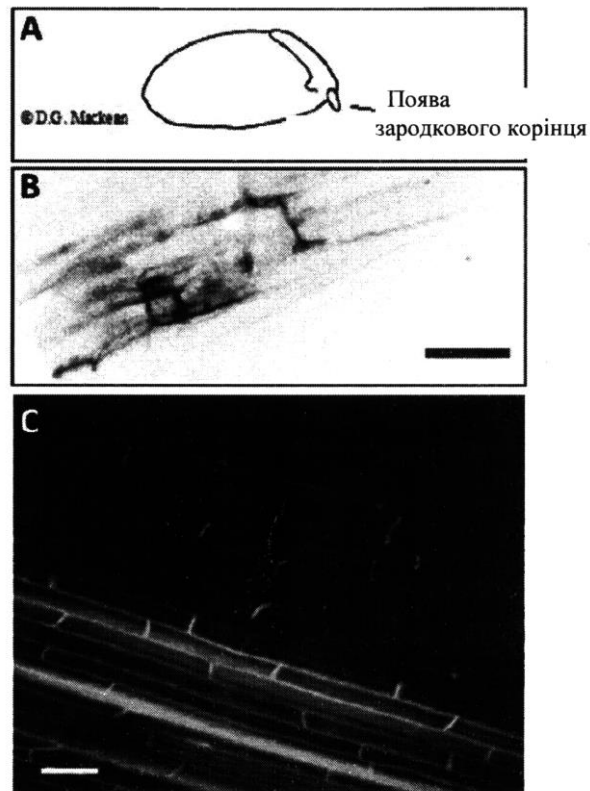
Фіг. 47



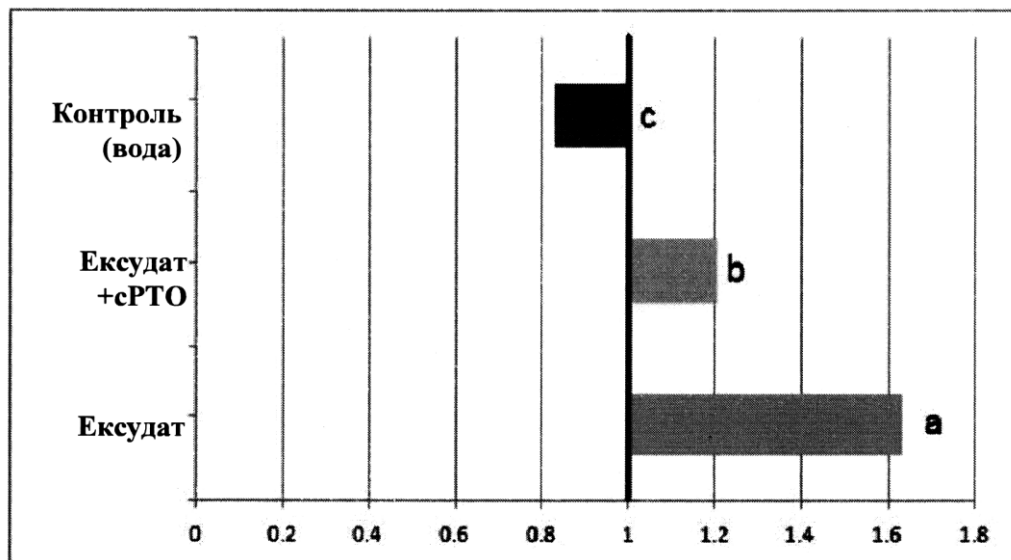
Фіг. 48



Фіг. 49



Фіг. 50



Фіг. 51

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601