



**А Г Р А Р Е Н У Н И В Е Р С И Т Е Т – П Л О В Д И В**  
**Ц Е Н Т Ъ Р З А Н А У Ч Н И И З С Л Е Д В А Н И Я , Т Р А Н С Ф Е Р Н А Т Е Х Н О Л О Г И И И З А Щ И Т А**  
**Н А И Н Т Е Л Е К Т У А Л Н А Т А С О Б С Т В Е Н О С Т**

Пловдив 4000; бул. Менделеев № 12; e-mail: [nic\\_au\\_plovdiv@abv.bg](mailto:nic_au_plovdiv@abv.bg)

Тел. +359/32/654420; 654427, [www.au-plovdiv.bg](http://www.au-plovdiv.bg)

**A G R I C U L T U R A L U N I V E R S I T Y - P L O V D I V**

Bulgaria, 4000 Plovdiv, 12 Mendleev Str., e-mail: [nic\\_au\\_plovdiv@abv.bg](mailto:nic_au_plovdiv@abv.bg)

Tel. +359/32/654420; 654427, [www.au-plovdiv.bg](http://www.au-plovdiv.bg)

**Информационен лист**

за научните проекти, финансирани целево от държавния бюджет

**Тема на проекта 01-20: "Изолиране и характеризиране на ендofитни микроорганизми и перспективи за приложението им в биологичното земеделие "**

**Финален отчет по проект 01-20**

**Научен ръководител:** Гл. ас. д-р Мариана Петкова, АУ, катедра "Микробиология и екологични биотехнологии".

**Научен колектив**

**Членове:**

1. доц. д-р Младен Найденов-АУ, катедра "Микробиология и екологични биотехнологии".
2. Гл. ас. д-р Славя Петрова АУ, катедра "Микробиология и екологични биотехнологии".
3. Ас д-р Величка Спасова- Апостолова, АУ, катедра "Микробиология и екологични биотехнологии".

**3. Цел и задачи на проекта:**

**Основни цели:**

През последните години се наблюдава повишен интерес по отношение на полезни микроорганизми във връзка с перспективите за приложението им в биологичното земеделие.

**Целта** на настоящето проучване е изследване на ендofитни щамове, физиолого - биохимични, генетични и културални характеристики за доказване на PGP-активност, с оглед на тяхното приложение в биологичното земеделие.

**За постигане на поставената цел са формулирани следните задачи:**

1. Изолиране на щамове от ендofитни микроорганизми.
2. Фенотипна характеристика на изолираните щамове.
3. Изследване на ендofитната природа на изолираните щамове.
4. Биохимичен скрининг за изолатите с цел определяне количеството на синтезираната индол - оцетната киселина, разтварянето на неорганични съединения на фосфора и производството на сидерофор.

5. Молекулярно-генетично характеризиране на изолатите.

5.1. Амплификация на рибозомна ДНК и секвениране на изолираните щамове микроорганизми.

5.2. Проследяване ефекта на изследваните щамове върху развитието на тест растения на съдови опити.

5.3. Проследяване ефекта на изследваните щамове върху развитието на тест растения на полски опити.

## ВЪВЕДЕНИЕ

Етимологично думата ендифит означава „вътре в растението“. Ендифитните микроорганизми колонизират растителните тъкани, без да причиняват видимо увреждане на растението гостоприемник (Petrini, 1991) и следователно могат да бъдат изолирани от повърхностно дезинфекцирани растителни тъкани (Hallmann et al. 1997). Проучванията показват, че ендифитни дрожди могат да бъдат изолирани от различни части на растенията, като *Williopsis saturnus* от корен на царевича (Nassar et al. 1990), *Candida guilliermondii* стъбла и листа на домати (Celis et al. 2014), щам WP1 на *Rhodotorula graminis* от *Populus trichocarpa* (Xin et al. 2009). Взаимоотношенията ендифит - гостоприемник могат да осигурят ползи за растението, като го предпазват от нападение на насекоми и болести (Hallmann et al. 1997). Следователно е възможно да се използват успешно като биоконтролни агенти (Sturz et al. 1997). През последните години се наблюдава увеличаване на изследванията свързани с изолиране на ендифитни дрожди, които стимулират растежа на растенията. Nassar et al. 2005 установява, че *Williopsis saturnus*, произвежда индол-3-оцетна киселина (IAA). Zhao et al. 2011, доказва успешното прилагане на *Pichia guilliermondii* при съхранение на плодовете от чери домати.

Научните изследвания на ендифитните бактерии и нишковидните гъби са по-задълбочени, в сравнение с изследванията свързани с ролята, биологията и генетиката на дрождите (Rosenblueth, 2006). Последните проучвания са обнадеждаващи по отношение на потенциала на ендифитните дрожди за промишлени и селскостопански приложения, като осигуряват силни стимули за по-задълбочен анализ. Те могат да имат значителни предимства пред бактериалните и гъбните ендифити, поради факта, че могат лесно да се култивират, съхраняват дълго време и безопасно да се прилагат при различни култури. Въпреки, че са необходими повече изследвания и особено полски опити за оценка на техния потенциал, използването им може да бъде биологичен начин за намаляване разходите за торене и изкуствено напояване в земеделието, както и потенциално увеличаване на добивите. Тяхното приложение изглежда особено обещаващо в областта на биоремедиацията на почви, замърсени с тежки метали или като биоконтролни агенти за защита на растенията от патогени (Stepniewska et al. 2013; Shukla et al. 2014). Въпреки това, много аспекти на биологията на ендифитни дрожди все още трябва да бъдат изяснени, особено когато става въпрос за механизмите, чрез които дрождите са в състояние да колонизират растенията. Няколко проучвания показват, че степента на колонизацията на корените е от решаващо значение за стимулирането на растежа, увеличаване на добива, както и толерантност срещу биотичен и абиотичен стрес (Varma et al. 2001; Oelmüller et al. 2009). Дрождите са широко разпространени в природата и съществуват във връзка с други микроорганизми като нормални обитатели на почвата, растенията и водата среда. Те участват в процесите на разтваряне на неразтворимите в почвата фосфати, трансформиране на комплексна органична биомаса в минерални съединения, които се използват от растенията, както и синтеза на растежни фактори, като аминокиселини, витамини и други (Фиг. 1). Един от най-известният представителен вид от тази група е *Saccharomyces cerevisiae* от нарастващ интерес в промишлеността процеси (Shin et al., 1991). Едни видове дрожди продуцират и индол-3-оцетна киселина (ИОК), като стимулират растежа и развитието на растенията (Spaepen et al., 2011; Spaepen et al., 2007; Teale et al., 2006). Ролята на микробната ИОК за растенията напоследък се изследва с повишено внимание. Бактерии (Ali et al., 2009), гъби (Reineke, 2008) и дрождите (Manulis et al., 1994) могат да насърчат растежа на растенията; следователно, микробите продуциращи ИОК могат да бъдат предложени като биотор в селското стопанство (Raut, 2017).



**Фигура 1. Механизъм на действие на ендифитните микроорганизми.**

Други видове дрожди могат да произвеждат антимикробни съединения, като токсини микоцини или още наричани „убийци“, които потискат или убиват на други прокариотни или еукариотни микроорганизми (Walker et al. 1995). Прилагането на дрожди „убийци“ при контрола на фитопатогенни плесени първоначално е предложено от Джейкъбс и Van Vuoren (1991) и оттогава посочи този подход за гъбички в превенцията на храната влошаване и при клинично приложение (Walker et al. 1995). Токсините от дрожди-убийци обикновено показват антагонистична активност срещу други дрожди и гъбички, които са тясно свързани с дрождите, произвеждащи токсини-убийци. Токсините-убийци на дрождите проявяват широк спектърен антагонистичен потенциал срещу няколко микроорганизми (бактерии, дрожди, гъби), които са или патогени, или отговорни за развалянето на храните, или са потенциални замърсители за ферментацията/ хранителната промишленост, те могат да имат перспективи за приложение като терапевтици, агенти за биоконтрол или консерванти на храни. Токсинът убиец на *Pichia kudriavzevii* показва силна антибактериална активност срещу няколко патогенни бактерии (Вајай et al. 2013). Дрождите се разпространяват системно, за разлика от някои плесенни гъби и може лесно да се култивират по подобен начин на бактериите. Те имат някои предимства пред бактериите, включително способността им да бъдат лиофилизирани по-ефективно от тях и следователно да бъдат по-лесно използвани в селскостопанското стопанство.

Тук въпросът е: как експериментално да се установи дали ендифитните дрожди са свързани по мутуалистичен начин с растението-гостоприемник? То може да се отговори, ако адаптираме предложението на Sieber, 2007 за използване на четирите постулата на Кох:

1. Появата на ендифит трябва да бъде свързана с полза за гостоприемника.
2. Ендифитът трябва да бъде изолиран от тъканта, в която е наблюдавана ползата и отглеждани в хранителна среда.
3. Ендифитът, който е култивиран в хранителната среда, трябва да генерира същата полза когато се въвежда отново в гостоприемник, свободен от ендифита.
4. След това отново ендифитът трябва да бъде изолиран от експериментално инокулирания гостоприемник.

При изолирането на ендифитите от растението, се изследва тяхното разпространение и видовото разнообразие в тъканите на плодове, семена и корени. Един метод е директно наблюдение на ендифитни дрожди вътре в растителни тъкани, използвайки микроскопска техника. Isaeva и сътр 2010 установяват, че клетките на дрождите най-често се намират в междуклетъчното пространство в растителните тъкани. При дрождите идентификацията се основава не само на тяхната морфология, но от съществено значение са биохимичните и физиологични им характеристики. Най-актуална е разработката на методи, които включват използване на проби, които се основат на ДНК последователности, уникални за вида. Напоследък широко се прилага изследване на генетичното разнообразие на дрождите с помощта на различни молекулярни маркери, като най-често се изследва полиморфизмът на вътрешни и интергенни транскрибирани (ITS, IGS) на рибозомния регион на ДНК и различни ДНК технологии като RAPD, AFLP, ISSR и SSR (Woudenberg 2015; Mehrabi 2017; Sun

2017, Kalendar 2014). Големият брой копия на ретротранспозоните в еукариотните геноми, както и относителната консервативност на важни последователности, позволяват те да послужат като основа на разработването на системи за молекулни маркери. Тези маркерни системи обикновено се основават на амплификация на фрагменти между краищата на ретроелементите и геномната ДНК между тях. Едни от често използваните PCR ретротранспозон-базирани молекулни маркери включват iPBS, SSAP, RBIP, IRAP и ретротранспозон-микросателит амплифициран полиморфизъм (Gozukirmizi et al., 2015). Между тях iPBS анализът, изследва приложимостта на молекулярни маркерни системи, базирани на подвижни генетични елементи (ПГЕ), за характеризиране на индуцирано генетично разнообразие при дрождите (Aydina et al., 2020).

Задачите, които се заложиха през първата година на проекта са изолиране на 32 дрожди от корените и семената на различни растения. Те се подложиха на първоначален скрининг за възможност ендодифитно да колонизират избраното моделно растение тютюн. От тях, десет изолата с ендодифитна активност се избраха за допълнителна оценка за способността им да стимулират растежа на растенията *in vitro* и *in vivo*. Те бяха идентифицирани и генотипизирани чрез групиране с D1/ D2 и ITS1-5.8S-ITS2 последователности от GenBank. С цел да се увеличат знанията ни за разпространението и биологичните свойства на ендодифитните дрожди, се инокулира тютюн като моделно растение с всеки един от дрождиевите изолати. Направи се микроскопски анализ на навлизането и локализацията на микроорганизмите в корените на тютюна. Проведеха се биохимични и молекулярни изследвания за идентифициране на изолатите и за преценка на взаимодействие между дрожди - растение. Това е важна информация, която ще ни даде яснота за по-пълното използване на дрождиевите метаболити, стимулиращи растежа на растенията, таксономична принадлежност. Един метод е директно наблюдение на ендодифитни дрожди вътре в растителни тъкани, използвайки микроскопска техника. Идентификацията на изолираните ендодифитни дрожди се основава не само на тяхната морфология, но от съществено значение са биохимичните и физиологични им характеристики.

През втората година на настоящия проект научната дейност се съсредоточи върху изследване на основни активности при избраните шамове свързани с подобряването растежа и развитието на растенията (PGP-активности) - количеството на разтварянето на неорганични съединения на фосфора, производство на индол-3-оцетна киселина ИОК, производството на сидерофори. Тествава се потенциала на изследваните шамове за биоконтрол при тест патогенни микроорганизми. Проведеха се на тестове с растения от сем. *Solanaceae* (тютюн, домати, пипер и патладжан) за проследяване ефекта на получените субстанции от изследваните шамове по отделно. Антимикробните свойства на дрождите се дължат основно за (1) конкуренция за хранителни вещества, (2) промени в рН в среда в резултат на свързан с растеж йонообмен или органична производство на киселина, (3) производство на високи концентрации на етанол, (4) секреция на антибактериални съединения и освобождаване на антимикробни съединения като токсини убийци или „микоцини“ (Suzuki et al., 2001; Голубев, 2006; Янг и Ягиу, 1978). Микоцините са извънклетъчни протеини или гликопротеини, които нарушават функцията на клетъчната мембрана в чувствителните микробни видове, които носят рецептори за тези стена (Голубев, 2006). Дрождите притежават способността да произвеждат хидролитични ензими, като  $\beta$ -глюканизи и хитинази, които унищожават други гъбични клетъчни стени (Jijakli и Leroivre 1998; Saligkarias et al. 2002 г.). Някои видове дрожди също са в състояние произвеждат сидерофорни съединения (съединенич на желязо (III) йони), които инхибират растежа на гъбните фитопатогени (Calvente et al. 1999;). В обобщение, основната форма на контрол е способността на дрожди да се развият бързо върху растителните органи, като възпрепятства развитието на други микроорганизми чрез конкуренция за пространство и хранителни съединения (Saligkarias et al. 2002; Vero et al. 2002). Генетичните детерминанти на феномена ензим „убиец“ са представени или от dsRNA, dsDNA или ядрени гени. Химическата природа на токсина „убиец“ е като цяло протеин или гликопротеин с ниско молекулно тегло. Токсинът се свързва с специфичен рецептор върху чувствителните клетки на други микроорганизми и ги убива (Hatoum et al. 2012). Самите шамове „убийци“ са имунизирани срещу собствения си токсин, но могат да бъдат чувствителни към токсините, отделени от други дрожди убийци (Hatoum, R., Labrie, S. and Fliss, I. 2012. *Frontiers in Microbiol.* 3: 1–12).

Основна насока през последната година на проекта е да се проследяване ефекта на изследваните шамове върху развитието на тест растения на съдови опити. С цел да се установи ефективността на микробния ендодифит, се анализара неговия ефект върху някои физиологични процеси в растението като фотосинтезата, проводимостта на устицата и интензивността на транспирацията. Растенията притежават способност за структурно-функционална адаптация към стресови въздействия от различно естество. Отговорите на растенията включват механизми за съхранение на оводнеността на тъканите като намаляване на транспирацията (Vassilev et al., 1998) и засилване на антиоксидантната

защита, някои от които са свързани с анатомични изменения в листата, а други – с биохимични процеси. Израз на анатомична адаптация могат да бъдат: (1) уплътнената структура на листата, ограничаваща листния газов обмен в резултат на намаляване на размерите на клетките и междуклетъчните пространства (Merakchiyska-Nikolova et al., 1990); (2) увеличеният брой устица с намалени размери за по-ефективен контрол върху транспирацията (Димитрова и кол., 2001); (3) увеличените размери на клетките от гъбчестия паренхим за съхраняване на повече вода във вакуолите им (Pancu-Filothou et al., 2001) и др. Известно е, че някои замърсители в средата, като например тежките метали, понижават скоростта на CO<sub>2</sub> фиксацията поради повишаване на устичното лимитиране и за сметка на мезофилни нарушения, свързан с пигментния апарат, фотосинтетичния електронен транспорт и въглеродната асимилация (Vassilev and Yordanov, 1997).

Фотосинтезата е добър индикатор за чувствителност на растенията към стрес от различен характер, защото поддържането на висока фотосинтетична активност е изключително важно при антиоксидантната защита и механизмите на възстановяване. Транспирацията е основен процес във водния режим на растенията, тъй като тя създава енергиен градиент, играещ роля на горен двигател на сокотечението в едно растение. Върху интензивността на транспирацията влияние оказват както морфологичните особености на листа и растението като цяло, така и факторите на средата, от които водещ е засушаването. Реакцията на растенията към този стресов фактор на организмово ниво е комплексна, защото отразява интеграцията на ефектите на стреса и физиологичния отговор на по-ниските структурно-функционални нива на организация във времето и пространството.

1. Флуоресцентната спектроскопия се използва широко в хранително-вкусовата промишленост за количествен анализ. Той е достатъчно чувствителен и специфичен, за да открие дори малки концентрации на съединения. Той може например да открие промени в структурата на протеини, въглехидрати, и липидите в растенията. Това е полезно за проверка на автентичността на хранителни продукти (Bachmann, 2006). Напредъка на оптичните технологии предлагат изключителни възможности за разработване на широка гама на високочувствителни фиброоптични сензори в много нови области на приложения. Оптичното влакно компонентите са успешно адаптирани към компилации с елементи на микрооптика като като лещи, огледала, призми и решетки (Mitschke, 2016; Dakin, 2017). Флуоресцентна спектроскопия се прилага при анализа на домати (Hoffmann, 2015) и зърнени култури (Karoui, 2011). Тяхната квалификация с помощта на тази техника се извършва чрез групиране на обекти с подобни характеристики за установяване на методи, свързани с тяхната класификация.

Това проучване представя приложение на методи за машинно изследване (ML), използващи флуоресцентни ламписпектроскопски данни за разграничаване между неинокулирани и инокулирани с дрожди домати проби. Тъй като традиционните техники за класифициране са едновременно тромави и трудни, методите с използването на изкуствен интелект, които предлагат лесно, по-точно и бързо решения в класификационните изследвания на селскостопански продукти, напоследък са често срещани предпочитан. Сред методите за изкуствен интелект ML включва голям брой алгоритми със стабилна способност за разграничаване, ако са извлечени силни характеристики от селското стопанство продукти. ML е метод, който има за цел да се подобри чрез използване на опит и данни (Mitchell, 1999). Въпреки че заема обща зона с изкуствен интелект, той също е самостоятелен предмет. ML алгоритмите предвиждат бъдещи данни, като използват предишни данни за предмет, за който те не са специално програмирани. Изследва се точността на модела, създаден с помощта на данни за обучениеизползване на тестови данни (Koza et al., 1996). Това проучване има за цел да класифицира изследваните домати за различни цели, използвайки ML на алгоритми. За разлика от предишни проучвания, това проучване ще представи приложение, базирано на ML прави разлика между неинокулирани и инокулирани с дрожди проби от домати. Видовете на използваните домати са „местно джудже“, „Идеал“ и „Пикадор“. Изследвани са спектрално с помощта на флуоресцентна спектроскопия и получените спектри бяха анализирани с шест различни ML алгоритми, а именно Hoeffding Tree, PART, IBk, Filtered Classifier, Logistic и Bayes Нет. Резултатите от анализа се очаква да демонстрират силната способност на различните ML методи за разграничаване между неинокулирани и инокулирани с дрожди домати сортове. Приносът на това изследване може да се обобщи, както следва.

- Използват се различни ML методи за анализ на спектроскопските данни.
- Използват се компютърно подпомагани системи за разграничаване на неинокулираните и инокулираните с дрожди проби от домати.
- Различните ML методи правят разлика между неинокулирани и инокулирани с дрожди домати разновидности с висока точност.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Изолитране на ендифитни дробжди от повърхностно дезинфекцирани на корени, семена и листа на различни растения

След повърхностна дезинфекция, корените и семената от различни растения се мацерират в 100 ml РВ при асептични условия при непрекъснато разклащане. Суспензията се филтрира през стерилни филтърни хартии и аликвоти (0,2 ml) се инокулират повърхностно на хранителна среда УМА (дрождев екстракт 5 g, малцов екстракт 10 g, агар 20g на 1 L вода), с хлорамфеникол за изброяване на общите популации ендифитни дробжди. Петритата се инкубирва при 25 ° C на тъмно в продължение на 5-7 дни.

### 2. Молекулярна характеристика на изолираните дробжди

#### 2.1. Изолитране на ДНК от дробжди

ДНК се изолира с комплект за пречистване на гъбична ДНК HiPurA™ (HiMedia, Индия) според инструкциите на производителя. Контролът на чистотата и концентрациите на геномна ДНК се провежда чрез електрофореза в агарозен гел.

#### 2.2. Молекулярна идентификация

Изолитраната геномна ДНК се използва като матрица в PCR анализ със специфични праймери за ITS1-5.8-ITS2 рибозомален регион. Фрагмент от ядрената рибозомна ДНК се намножи с ITS 5 универсален праймери (White et al., 1990) и NL2 (Kurtzman, 1998) като се извърши PCR анализ в 20 µl крайни обеми на реакция, съдържащи 1 µl (30-50 ng) ДНК и 2 µL 10 × реакционна PCR буферна смес, съдържаща 200 nM разтвор на dNTPs, 5 µM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl от 10 µM от двата праймера и 0,25 µl от 5 U / µl Red-Taq ДНК полимераза (Canvaх, Испания).

Условията на реакцията на усилване се състоят от 2 минути при 94 ° C, последвани от 35 цикъла от 30 s при 94 ° C, 30 s при 54 ° C и 2 минути при 72 ° C с окончателно удължаване от 5 минути при 72 ° C. Очакваните ампликони бяха изрязани от гела и пречистени с комплект за изолитране на гел (Exgene Cells SV, mini, Gene All, UK). PCR продуктите се разделят на 1% агарозен гел, оцветен с SafeView (NBS Biologicals, UK) при 100 V за 50 минути, като се използва VWR Mini. Получената последователност беше анализирана със софтуер BLAST и сравнена с нуклеотидни последователности в базата данни на генната банка ncbi.nlm.nih.gov). С анализа на многопосочността, ние приложихме програмата MEGA 7 с двупараметричен модел (Kumar et al. 2001), за да изчислим базовия състав, двупараметричното разстояние на Kimura и съотношението на дивергенция на последователността. За филогенетичен анализ използвахме MEGA 7 (метод за присъединяване на съседи), за да проучим връзката на различни видове, за да изградим филогенетичното дърво.

#### 2.3. PCR техники за генотипиране

Генетичната изменчивост на дрождиевите изолати се анализира чрез използване на RAPD, ISSR (Denduangboripant et al., 2010) и iPBS праймери, проектирани (Kalendar et al., 2010). Нуклеотидната последователност на праймерите е представена в таблица 1. PCR реакциите се провеждат в 25 µl реакционна смес. Всяка реакционна смес съдържа 25 ng матрична ДНК, 1 × PCR буфер с 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM праймер, 0,2 mM всеки dNTP и 0,2 µl Red-Taq ДНК полимераза (Canvaх, Испания). PCR амплификация се извършва в Thermal Cycler Prime 57016-2 (Cole-Parmer, UK) при следните условия: начален етап на денатурация при 98 °C за 1 min, последван от 30 амплификации при 98 °C за 5 s, при 45-52 °C (в зависимост от нуклеотидната последователност) за 20 s и при 72 °C за 60 s, последвано от окончателно удължаване от 72 °C за 3 минути. Всички PCR се повтарят поне два пъти за всеки изолат. В изследването са използвани пет iPBS праймери конструирани от Kalendar et al., (2010) и два праймера ISSR за профилиране на ДНК и оценка на генетичното разнообразие на дрождиевите изолати. Праймерите, които генерират няколко PCR продукта, бяха изключени. Като стандарт се използва щам *Saccharomyces cerevisiae* NBIMCC 1883 (ATCC 9763) закупен от Българска национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури.

Таблица 1. Използвани праймерни в молекулярните анализи

iPBS праймер	Нуклеотидна последователност	Температура на присъединяване
2394	GAGCCTAGGCCA	45
2087	GCAATGGAACCA	50
2238	ACC TAG CTC ATG ATG CCA	52
ISSR	Нуклеотидна последователност	Температура на



праймер		присъединяване
UBC-807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50
UBC-809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	52
RAPD праймер	Нуклеотидна последователност	Температура на присъединяване
M 13	CAGGAAACAGCTATGAC	51,5

PCR продуктите се разделят чрез електрофореза при 70 V в продължение на 3 часа в 1,5% агарозен гел с 1 x TBE буфер (Gibco BRL) с използване на TBE буфер (89 mM Tris -HCl, 89 mM борна киселина, 10 mM EDTA, pH 8,0) с прибавено Safe View (NBS Biologicals, Великобритания). Ампликоните се разделяха VWR Миди електрофореза (VWR) за визуализация. 100-bp ДНК стълба (Gibco BRL) се използва като маркер. Получените резултати, наблюдавани върху гела се документираха чрез UV-Вю и изображенията се документираха с 8.0 мегапиксела камера Canon IXY (Япония).

Анализът на клъстера беше извършен с приблизителни оценки, като се използва методът на групиране по двойки с средна аритметична стойност (UPGMA), от който беше получена дендрограма, показваща вътревидовото и междувидовото генетично разнообразие. Предполага се, че всяка фрагмент с уникален размер съответства на уникален локус. За да се изгради бинарна матрица, възпроизводимите фрагменти са оценени като налични (1) или отсъстващи (0).

### 3. Изследване на способността на дрождиитевте изолати ендифитно да колонизират тютюн (*N. tabacum*)

#### 3.1. Подготовка на инокулум

Дрождиитевте култури, се инокулираха в инкубатор върху декстрозен агар на Sabouraud на тъмно при 27 ° C за 24 часа.

#### 3.2. Подготовка на растителния материал

През първата експериментална година сме използвали традиционен български сорт тютюн – Крумовград 58. Сортът сред най-отглежданите в страната. Тютюнът Крумовград 58 е използван и в предходни изследвания за доказване на ендифитна природа при плесени гъби. Опитът ни показва, че той е подходящ за провеждане на подобни експерименти. Данните получени при тютюна от първата експериментална година ще ни послужат, като добра отправна точка за подбор на най-перспективните изолати, уточняване на условията и провеждане на опитите и с други представители от сем. *Solanaceae*. Заложени са общо 35 броя растения от които 20 растения са инокулирани почвено с 10 изолата от дрожди (2 повторения) и 5 растения са контролни (Фиг. 2). Растенията са прехвърлени в съдов опит в кофички с обем 400 ml торф и перлит през май, 2020 (85-дневни растения). Използвани са 85 дневни растения от тютюн сорт Крумовград 58. Това ни осигури възможност да тестваме в 2 дати, дали инокулираните дрождииви изолат проявяват ендифитна активност и колонизират корена и другите части на растението.

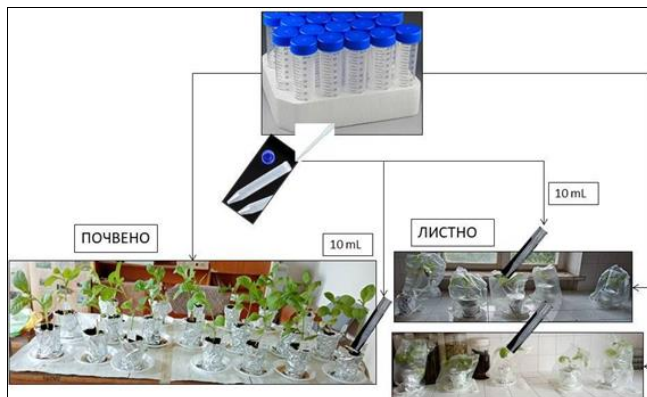
Отделно други 10 растения са третитани чрез листно пръскане с всеки от 22 дрождииви изолата, тъй като при листното инокулиране няма необходимост да се взема корен (още на 1-вата дата) и да се унищожава растението. Осигурена е пространствена отдалеченост според възможностите на помещението. Листното инокулиране ни помогна да преценим доколко е ефективно, като техника и да сравним данните при напръсканите и новообразуваните листа във връхната част на растението. След извършеното инокулиране растенията са поляти със 100 mL H<sub>2</sub>O (питейна) вода в подложките, а последващите поливки са осъществени също в подложките с 50 mL (питейна) вода.



## Фигура 2. Подготовка на растителния материал за инокулация с изолираните дрожди.

### 4. Техники за инокулация

Третирането се извършва по два начина, почвено внасяне близо до корена и листно пръскане със суспензия с концентрация  $1 \times 10^4$  от всеки щам по отделно (фиг. 3). Използвани бяха общо 100 растителни експлантите от инокулираните растения и от всяко растение бяха обработени 20 (2 x 10, в две повторения) по двата метода на инокулация - почвен поливане и листно пръскане. Контролните растения не са инокулирани с дрождиева суспензия.



Фигура 3. Две техники на инокулация на тютюневите растения с изолираните дрожди.

### 4.3. Оценка на способността на дрождиевите изолати ендифитно да колонизират тютюн (*N. tabacum*)

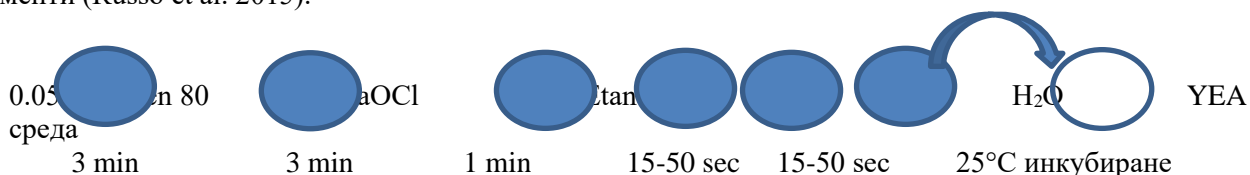
На 14-ия ден след инокулацията са взети проби от третирани растения, за да се установи наличието на дрожди в тях чрез инокулиране на експлантите от листа, стъбла и корени върху YEA среда. Взето е и по едно контролно растение. Растенията се изваждат от почвата и се измиват с  $dH_2O$ . Преди въвеждането на експлантите *in vitro* се извършва повърхностна стерилизация на листата, стъблата и корените според Petkova et al., 2020 b (Фиг. 4). Преди въвеждането на експлантите в *in vitro* среда, повърхностната стерилизация на листата, стъблата и корените се извършва в продължение на 3 минути в 0,008% Tween 80 w / v, 3 минути в разтвор на натриев хипохлорит NaOCl, 1 минута в 70% етанол и три пъти изплакване със стерилна  $dH_2O$  за 50 s. За контрол на качеството на антисептичната инокулация е направен антибиотичен хранителен бульон за посевка на последното измиване със стерилна  $dH_2O$  (използвана при стерилизация на експлантите), за да се контролира извършената стерилизация и да се докаже, че отглежданите колонии от дрожди в експлантите не се дължат епифитни микроорганизми по растенията. Шест листни диска с приблизително  $1 \text{ cm}^3$  бяха инкубирани в хранителна среда с добавени антибиотици с концентрация 0,02 g ампицилин, стрептомицин и тетрациклин.

Извършено е и посяване на хранителна среда без антибиотик на последната промивна стерилна  $H_2O$  (използвана при стерилизирането на експлантите) за контрол на извършената стерилизация и за да се докаже, че прорасналите дрожди в поставените експлантите не се дължи на повърхносния слой на растенията. Шест листни диска с големина приблизително  $1 \text{ cm}^3$  бяха посявани на хранителна среда с прибавени антибиотици по 0.02 g ampicillin, streptomycin и tetracycline. Присъствието на дрождите беше отчетено на 5 ден след инкубиране на  $27^\circ\text{C}$  на тъмно.

Честотата на изолиране (IF) на дрождите се изчислява по следната формула:

$$\text{Честота на изолиране (IF)} = N_i / N_t \times 100$$

Където  $N_i$  е броят на сегментите, от които са изолирани микроорганизми; и  $N_t$  е общият брой сегменти (Russo et al. 2015).



Фигура 4. Схема на стерилизация на тютюневи експлантите.

### 4.4. Микроскопско изследване на взаимодействието на дрождиевите изолати с корените на тютюн

Взаимодействието на дрождиевите изолати с корените на *N. tabacum* е изследвано след обработка и оцветяване на корените с кисел фуксин по метода на Isaeva, използва се увеличение (4 x, 10 x, 20 x и 40 x) на светлинен микроскоп Leica M320, снабден с камера за фотодокументация.



## **5. Определяне на биосинтетичния потенциал на изследваните дрожди**

### **5.1. Количествено определяне на индол-3-оцетна киселина чрез използване на реагент Salkowski**

За количествено определяне на произведените индол-3-оцетна киселина (ИОК), изолати от дрожди се отглеждат в епруветка в YPD среда със или без 0,1% (w/v) L-триптофан (L-Trp) и се инкубира тъмно при 30° C и за 5 дни. Един милилитър от клетките се пелетират чрез центрофугиране при 3000 g за 5 минути и 0,5 mL от супернатантът се смесва с 0,5 mL реагент Salkowski (2 mL 0,5M желязо (III) хлорид и 98 mL 35% перхлорна киселина) (Gordon & Weber1951). След 30 минути оцветете развитието (червено) се определя количествено с помощта на спектрофотометър (Unico 1200-Спектрофотометър, САЩ) при 530 nm. Беше направена калибровъчна крива, използваща чиста **индол-3-оцетна киселина** установено за изчисляване на концентрацията на ИОК Производството на IAA всеки изолат от дрожди е определено чрез инокулиране на YPD среда, съдържаща 0,1% (w/v) L-триптофан с и се инкубира на тъмно при 28° C. След инкубация, произведеното ИОК количествено е отчетено спектофотометрично.

### **5.2. Скрининг за разтваряне на неорганични фосфати**

Pikovskaya (PVK) medium (Pikovskaya, 1948), съдържа: глюкоза, 10 g; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g; NaCl, 0.2 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g; KCl, 0.2 g; дрождиев екстракт, 0.5 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.002 g; and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.002 g.

### **5.3. Скрининг за производството на сидерофори и протеолитична активност**

За откриване на производството на сидерофор от дрождите се използва среда с 2% Малцов екстракт (ME), в който дрождите се развиват добре и след което се прибави CAS (Chrome Azurol S) съгласно Schwyn и Neilands (1987). След инокулиране на средата, дрождите се инкубираха при 25° C за 7 дни, на тъмно. Растежът на дрожди и средата промяна на цвета (от синьо към лилаво или жълто) беше проследено.

**Протеолитична активност се изследва** чрез метода на дифузия в агар на КДА, съдържаща обезмаслено мляко.

## **6. Скрининг за антимикробно действие на изолираните микроорганизми срещу фитопатогени**

### **6.1. Антимикробна активност на изследваните дрожди срещу фитопатогенни бактерии**

Определянето спектъра на антимикробна активност е основен етап в характеризирането на дрожди и на техния пробиотичен потенциал. Затова внимателно са подбрани и различните тест-култури. Фитопатогенните бактерии са предоставени от колекцията на катедра „Фитопатология“. Като тест-микроорганизми са използвани патогенни микроорганизми *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas vesicatoria*. Бактериалните щамове се култивират на КДА среда при 30° C. Скринингът се проведе, използвайки агар-дифузионния метод, описан от Yang и съавт, 2012. Петритата са инкубирани за 24 h при 30° C. Всеки един от щамовете е изследван в два независими експеримента.

### **6.2. Антимикробна активност срещу плесенни гъби от род *Fusarium*, *Rhizoctonia* и *Alternaria***

Изследваните щамове от дрожди бяха тествани за определяне техните противогъбични действия срещу *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*. Фитопатогенните гъби са предоставени от колекцията на катедра „Фитопатология“. Плесенните гъби се култивираха при 25° C върху YEPD среда (10 g екстракт от дрожди, 20 g глюкоза и пептон и 20 g агар) в продължение на 7 дни. След това, плесенните конидии се събраха чрез промиване със студена стерилна дестилирана вода на и се използваха за приготвяне на инокулим с концентрация 1x 10<sup>6</sup> спори / ml. Тестовете за антибактериална активност са проведени по метода дифузия в агар (Bauer et al., 1966).

## **6. Скрининг за синтез на микоцини от изследваните щамове дрожди срещу тест-култури и фитопатогенни гъби**

Скринингът за синтез на микоцини-продуциращи (ензими „убийци“) щамове дрожди срещу плесенни гъби и бактерии се проведе в среда с метиленово синьо-YPD (цитрат-фосфат буфер, pH 4,5-4,7, 3% метиленово синьо) при 30° C. Петрита са повърхностно инокулирани предварително с чувствителен щамове *S. cerevisiae* NCYC1006 и тест – култури *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*. Тестваните щамове бяха инокулирани чрез поставяне на 100 ml от културална течност в ямка 8 mm и дискове с размер 8 mm. Активността на отделения ензим убиец е открита, когато зона на инхибиране около тесваната дрождиева колония.

За доказване на белтъчната природа на инхибиторните агенти получените след неутрализиране на културалната течност и безклетъчните супернатанти (CFS) са обработвани с 1 mg/ml протеолитични ензими – протеиназа К (100 U/mg) при 65°C за 60 min. Първоначално се накапва изследваните щамове от дрожди по 100 µl във всяка ямка. Петритата се инкубираха при 30°C в продължение на 24 часа и активност на отделения ензим убиец е отчетена, когато зона на инхибиране около тестовата дрождиева колония.

### **7. Провеждане на съдови и полски опити с тест - растения от сем. Solanaceae за проследяване ефекта на получените субстанции от изследваните щамове по отделно.**

#### **7.1. Проследяване ефекта на изследваните щамове върху развитието на тест растения от тютюн (*N. tabacum* L.) на съдови опити.**

Третирането се извършва по два начина, почвено внасяне близо до корена и листно пръскане със суспензия с концентрация  $1 \times 10^4$  от всеки щам по отделно. Използвани бяха общо 55 растителни експлантати от инокулираните растения и от всяко растение бяха обработени 20 (2 x 10, в две повторения) по двата метода на инокулация - почвен поливане и листно пръскане. Контролните растения не са инокулирани с дрождиева суспензия. За провеждане на опита са заложени общо 55 саксии с 3,5 л вместимост. Разсада е от сорт Крумовград 58 взет от лехи общо 25 растения са инокулирани почвено, 25 листно и 5 контроли.

За по-добро проследяване на третираните растения преди разсаждане са измерени корен и надземна част. След третиране на растенията са извършвани биометрични измервания на височина на надземна част и стъбло, дължина на корен, брой листа, маса на листа и корен на определени интервали на 7ми, 14ти, 22ри, 29ти и 39ти ден след третиране. На 14 ден след първо третиране на част от растенията е направено и допълнително второ третиране.

#### **7.2. Проследяване ефекта на изследваните щамове върху развитието на тест растения от пипер, патладжан и домати на съдови опити.**

#### **7.3. Отчитане промяна в параметри на фотосинтезата и транспирацията**

Параметри на фотосинтезата и транспирацията - Физиологичните измервания ще се извършват върху три напълно развити, неувредени листа на еднаква физиологична възраст. За целта се използва преносима фотосинтетична система Q-box CO<sub>2</sub> - Plant CO<sub>2</sub> Analysis Package (Qubit Systems Inc., Canada).

#### **7.4. Статистически анализ на получените данни.**

За статистическата оценка е използван софтуер Statistica 7.0 [50]. Суровите данни бяха обработени от *t*-теста (зависими проби) и е извършен клъстерен анализ за групиране на изследваните места за вземане на проби въз основа на изследваните биометрични и физиологични параметри. Връзките между изследваните параметри в събраните проби от листа бяха тествани с помощта на корелационни коефициенти на Pearson. Всички анализи са значими при  $p < 0.05$ .

## **РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

### **1. Молекулярно генетична характеристика**

През първата експериментална година се събраха и се анализираха морфологично 22 изолата от дрожди от различни растения и субстрати. Изолатите от спонтанно ферментиралите теста са изолирани в предходни изследвания на научния колектив (Petkova, 2020 a). Характеризирането на изолираните видове е направено на базата на тяхната клетъчна морфология, културални и други физиологични характеристики. Установено е, че всички изолати са дрожди и се характеризират със сферична или удължено-овална формата. Видовете се размножават чрез пъпкуване и чрез спори. Аскоспорите се различават значително между видовете по формата, което спомогна за морфологичното разграничаване на изолираните дрожди. В съгласие с няколко таксономични изследвания (Barnett et al., 1990, Kreger-van Rij, 1984) 4 изолата се отнесоха към спорообразуващите дрожди от сем. *Saccharomycetaceae*, а останалите към неспорообразуващите дрожди.

Видовата идентификация на всеки нов изолат е първото условие за неговото бъдещо проучване. Изготвянето на молекулярен профил на изследваните щамове е основа за тяхното генетично паспортизиране, което е задължително при евентуалното им технологично приложение. За постигане на по-пълна и коректна видова идентификация на ризосферните изолати е използван един от широко приетите методи видова идентификация чрез секвениране на гена за 18S rRNA и сравнение на получените секвенции със световните бази данни. Два от работните щамове .

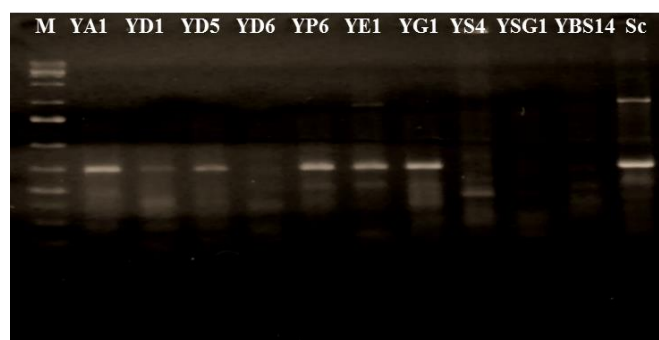
Изолирана е тотална ДНК от всеки щам, която се амплифицира, чрез използване на универсални праймери за идентификация на еукариотни микроорганизми. За всеки дрождиев щам е получен PCR-продукт от 1100 бази и е подложен на двукратна стандартна процедура на секвениране в две посоки. Чрез прилагането на BLAST алгоритъм получените секвенции са сравнени с депозирани в NCBI. След анализиране на новополучената секвенция се установява. Трябва също така да се отбележи, че през последните няколко години базата данни на NCBI е значително обогатена с нови идентифицирани видове по отношение на групата на сахаромицетните дрожди от отдел *Saccharomycota* (Табл. 2).

**Таблица 2.** Молекулярно-генетична идентификация на изследваните дрождиеви щамове на базата на секвенционен анализ.

№	Име на изолат	Идентификация	Ниво на сходство, %	Присъединителен номер в Genbank
1	YA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	MW774573.1
2	YC1	<i>Kazachstania unispora</i>	100	MW774572
3	YD1	<i>Kazachstania unispora</i>	99	MW774571
4	YD5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	OL889951
5	YD6	<i>Pichia acaiae</i>	99	MW756319
6	YP6	<i>Pichia fermentans</i>	100	MZ798453.1
7	YE1	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	100	OL904963
8	YG1	<i>Pichia membranifaciens</i>	100	MW7561305
9	YS4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	MW7561314
10	YSG1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	MW756313
11	YBS14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	MZ798454.1
12	YSW1	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	100	OL889954
13	YFIG1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	MW756315
14	YR1	<i>Pichia membranifaciens</i>	99.98	MW7561304
15	YR3	<i>Kazachstania servazzii</i>	100	MZ798452
16	YH15	<i>Kazachstania unispora</i>	100	MZ798450

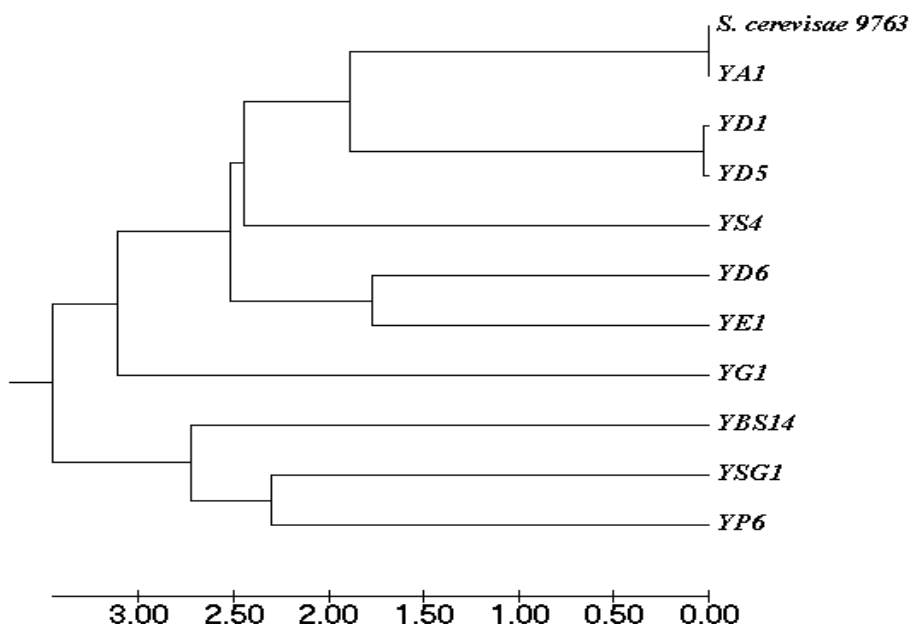
### 1. Генотипиране на изследваните дрождиеви видове

За извършване на молекулярния анализ и генотипиране на изследваните дрождиеви видове са подбрани молекулно-маркерни системи основаващи се най-високо вариабилните участъци в генома ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) и iPBS праймери (nter-priming binding sites) (Фигура 5). Въведена е маркерна система базирана на комбинация от iPBS и ISSR за генотипиране на изследваните изолатите от дрожди. Изолираната геномна ДНК от десетте дрожди се използва като матрица в RAPD и iPBS -ISSR комбиниранияте PCR анализи за установяване на междувидово и вътревидово разнообразие на изследваните щамове.



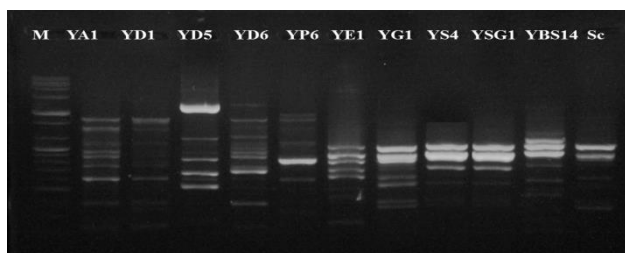
Фигура 5. PCR профили на дрождиеви изолати с праймерни двойки UBS-809 и iPBS-2087.

При анализът с праймери UBS 809 и iPBS праймерите (2087) се амплифицират общо 39 фрагмента, от които 9 (23,07%) са полиморфни (Фиг. 5). Анализът на клъстера беше извършен с приблизителни оценки, като се използва методът на групиране по двойки с средна аритметична стойност (UPGMA), от който беше получена дендрограма, показваща връзките между отделните видове. Съседното присъединяване е най-широко използвания метод за получаване на филогенетични дървета, особено когато еволюционните разстояния са къси. (Kumar, 2016). Дендрограмата UPGMA на фиг. 6, получена от клъстерните анализи нас коефициент на сходство на Jaccard, групира 10-те дрожди в три основни подклъстера и референтен щам *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) (фиг. 6). Първият подклъстер включваше спорообразуващите дрожди на изолатите YA1, YD1 YD5, YS4 и *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Неспорообразуващите дрожди бяха групирани в подклъстер, който включва YG1, YE1, YP6. Членовете на родовете *Rhodospodium*, *Pichia* и *Candida* изглежда се различават от всички останали и образуват клъстер. Най-отдалечени са дрождите от род *Rhodospodium* - YSG1, които са подобни по профили с YBS14 и nYP6.



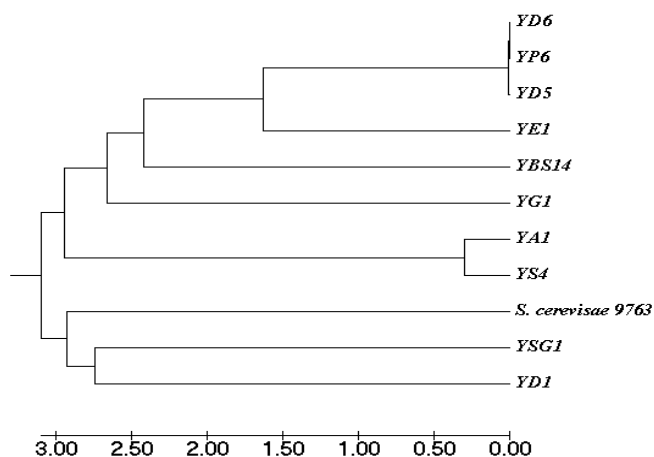
**Фигура 6.** Филогенетично дърво, направено по метода UPGMA (Sneath, 1973). Показано е оптималното дърво със сумата на дължината на разклонението = 23.70220356. Еволюционните разстояния са изчислени с помощта на метода за максимална композитна вероятност [0-липса на амплификация, 1-амплификация] и са в единици от броя на заместванията на основата на място. Анализът включва 11 нуклеотидни последователности. Всички позиции, съдържащи пропуски и липсващи данни, бяха елиминирани. Еволюционни анализи бяха проведени с помощта на MEGA7.

При RAPD-PCR анализът с праймери M13 се амплифицират общо 76 фрагмента, от които 15 (19,73 %) са полиморфни (Фиг. 7).



**Фигура 7.** RAPD-PCR профили на дрождиеви изолати с праймер M13.

Дендрограмата UPGMA на фиг. 8, получена от клъстерните анализи на коефициент на сходство на Jaccard, групира 10-те дрожди в три основни подклъстера и референтен щам *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Първият подклъстер включваше неспорообразуващите дрожди на изолатите YD6, YP6, YE1, YD5. В съответствие с резултатите от iPBS и ISSR комбинирания PCR анализ, неспорообразуващите дрожди бяха групирани в подклъстер който включва родовете *Rhodospiridium*, *Pichia* и *Candida*. *Saccharomyces cerevisiae* 9763 се различава и клъстерира самостоятелно.



**Фигура 8.** Филогенетично дърво, направено по метода UPGMA (Sneath, 1973). Показано е оптималното дърво със сумата на дължината на разклонението = 21.848238. Еволюционните разстояния са изчислени с помощта на метода за максимална композитна вероятност [0-липса на амплификация, 1-амплификация] и са в единици от броя на заместванията на основата на място. Анализът включва 11 нуклеотидни последователности. Всички позиции, съдържащи пропуски и липсващи данни, бяха елиминирани. Еволюционни анализи бяха проведени с помощта на MEGA7.

## 2. Оценка на способността на дрождиевите изолати ендифитно да колонизират тютюн (*N. tabacum*)

Поради ограничената информация за ендифитната природа и взаимодействията между дрождите и растенията е необходимо да се изясни дали дрождите проявяват специфичност по отношение на вида растение.

Една част от изолатите от дрожди са получени от теста ръж, пшеница, ягоди и безсмъртниче и гроздови плодове (Таблица 2) Това наложи тяхното тестване и при представители на други семейства растения. Тютюна е представител на сем. *Solanaceae* и от една страна би могъл да отговори на въпроса дали дрождите имат ендифитна природа и проявяват видово специфични предпочитания. Изследва се честотата на колонизация на разсад от тютюн от сорт Крумовград 58 от изолираните дрожди тертирани по два начина на инокулиране - почвено и листно. Дрождите не са прилагани в контролните растения. От изследваните изолата от дрожди, десет проявиха ендифитна природа. За установяване на колонизирането на различните тъкани на тютюна са вземани проби от корен, стъбло и листа от почвено и листно третираните растения на 14 ден след инокулирането (Фиг. 9 А).

При използване на техниката директно внасяне на инокулат в почвата, най-висока честота на колонизация от 83,33% до 100% е отчетена при щамовете YAI, YD1, YSG1 и YBS14, респективно. Изолат YE1 е с по-ниска степен на колонизация на корените на тютюн 66,66% (Фиг. 9 В). След обработката на данните прави впечатление по-високият процент на честотата при корени и стъбла, в сравнение с листата при почвено третиране. Изключение прави изолат YSG1 и YBS14, при които има много висок процент колонизация на листа (83-100%).

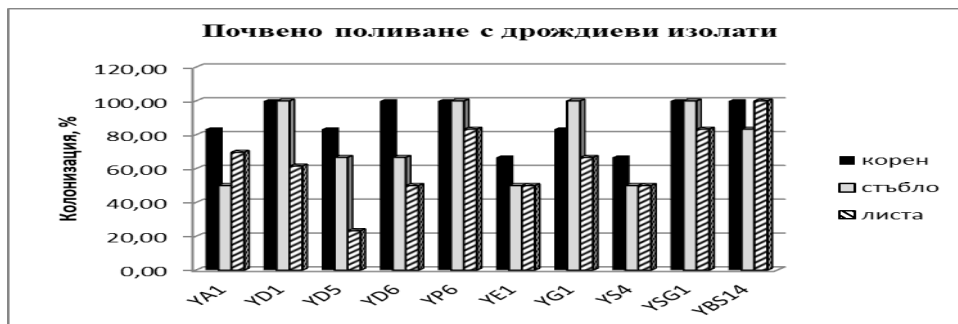
Третирането чрез листно пръскане показва придвижването на дрождите с низходящия поток и колонизацията на корен. Резултатите от кореновата колонизация са най-високи при изолатите YAI и YBS14, а най-слабо при третиране с изолат YD1, YD5 и YS4. Сравнително високи стойности са отчетени при инокулиране на листните и стъблените експлантати върху YEA среда –до 100% при изолат YAI, YD6, YP6, YSG1 и YBS14, а най-ниски процент се установи при изолат YG1 -33,33% (Фиг. 9 С).

А.)

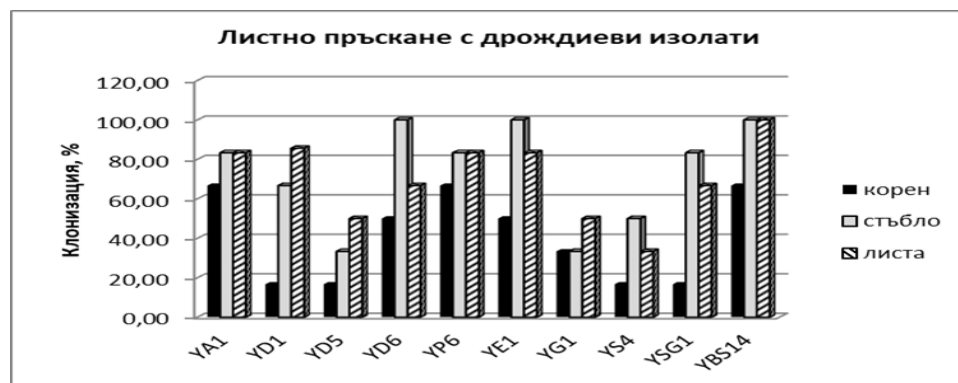




В.)



С.)



**Фигура 9.** Колонизация на тютюневите растения от изследваните дрожди.

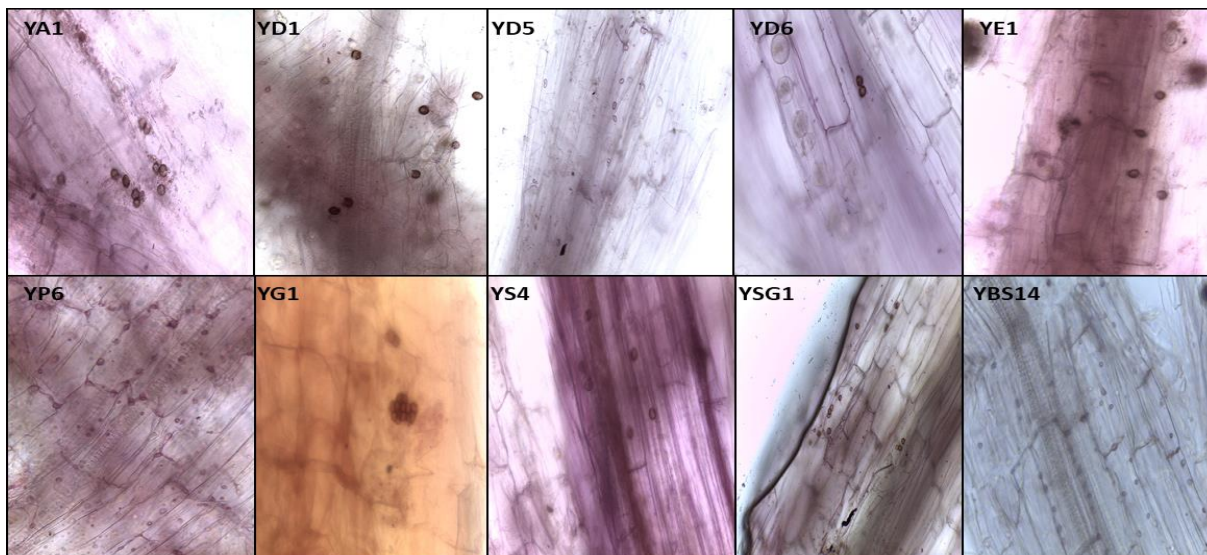
А) Тютюневи растения преди (в ляво) след 14 дена след третиране с изолат YBS14 (в дясно).

В) Процент на колонизация на тютюневите растения на 14 ден след третиране с дрождиеви изолати, внесени чрез директно поставяне на инокулант в почвата

С) Процент на колонизация на тютюневите растения на 14 ден след третиране с дрождиеви изолати чрез листно пръскане.

### 3. Микроскопско изследване на взаимодействието на дрождиевите изолати с корените на *N. tabacum*

С цел да установи локализацията на дрождите след навлизане в растенията се проведе микроскопско изследване на корените на третираните тютюневи растения. Клетките на дрождите най-често са разположени в междуклетъчното пространство на клетките в корена на растенията (Фиг. 9). В някои случаи клетките на дрожди бяха открити в цитоплазмата на растителните клетки, както е случая с изолат YP6 (Фиг. 10, втори ред). Един от възможните механизми, отговорни за проникването на дрожди в растителните клетки, може да бъде ендоцитоза (Aniento Robinson, 2005). Ендоцитозата е процес, при който клетката поглъща различни по размер частици от околната среда. Осъществява се чрез вгъване на клетъчната мембрана, при което от страната на цитоплазмата се получава малка вакуола, носеща поетия продукт. При приготвянето на микроскопски препарати не могат да бъдат изключени систематични грешки: дрождовите клетки, обитаващи междуклетъчното пространство, могат да проникнат в растителните клетки, ако целостта на клетката бъде нарушена. Въпреки това някои автори допускат и вътреклетъчното развитие на ендифитни микроорганизми (Nassar et al., 2005). Необходими са по-нататъшни проучвания за разглеждане на въпроса относно механизма на проникване на дрождени клетки в растителни тъкани.



**Фигура 9. Микроскопска снимка на дрождиеви клетки от 10-те различни изолата в корени на тютюн.**

#### **4. Биосинтетичен потенциал на изследваните щамове.**

##### **4.1. Характеристики определящи щамовете, като микроорганизми подпомагащи растежа и развитието на растенията (PGPR).**

Повечето от нашите познания за характеристиките на ендофитите, повишен растеж на ендофити, изследване на бактериални ендофити и сравнения могат да бъдат полезни при изследване на ендофитен мозък. Това включва производството на фитохормони, намаляване на стреса, защита срещу патогени и увеличаване на приема на хранителни вещества от растението.

Изследването на ендофитните бактерии е по-задълбочено, ендофитната биология и екологията на дрождите остават слабо разбрани. Това изглежда от сходния им начин на живот по отношение на техните екологични ниши, както и тяхната физиология, включително тяхното едноклетъчно съществуване, адаптирано към водна среда, бързи темпове на растеж и значението на биофилмите в техния жизнен цикъл.

Повечето от нашите знания за характеристиките на ендофитите и начина на действие идват от изясняването на бактериалните ендофити. Това включва производството на фитохормони, намаляване на стреса, защита срещу патогени и увеличаване на приема на хранителни вещества от растението.

Изследването на ендофитните бактерии е по-задълбочено, ендофитната биология и екологията на дрождите остават слабо разбрани (Eid et al. 2021). Това изглежда от сходния им начин на живот по отношение на техните екологични ниши, както и тяхната физиология, включително тяхното едноклетъчно съществуване, адаптирано към водна среда, бързи темпове на растеж и значението на биофилмите в техния жизнен цикъл.

Дрождите, прилагани върху растенията, изглежда се разпространяват систематично, за разлика от някои гъбички и могат лесно да бъдат култивирани по начин, подобен на бактериите. Те също така имат предимства пред бактериите, включително способността им да се сушат чрез замразяване по-ефективно от бактериите и следователно да бъдат по-лесни за разпространение за селскостопанска употреба (Brooks et al. 1994). В допълнение, има доказателства, които предполагат възможността за образуване на смесен биофилм, съдържащ както бактерии, така и дрожди (Firrincieli et al. 2015). Производството на растителни хормони осигурява директен метод за насърчаване на растежа на растенията от ендофити. Ауксините и гиберелините стимулират растежа на растенията, като подпомагат растежа на корените и удължаването на стъблото, както и в по-широк смисъл клетъчната пролиферация и удължаване. По-специално, производството на индол-3-оцетна киселина (IAA) от ендофитни дрожди е широко докладвано в литературата (Doty 2013; Nassar et al. 2005).

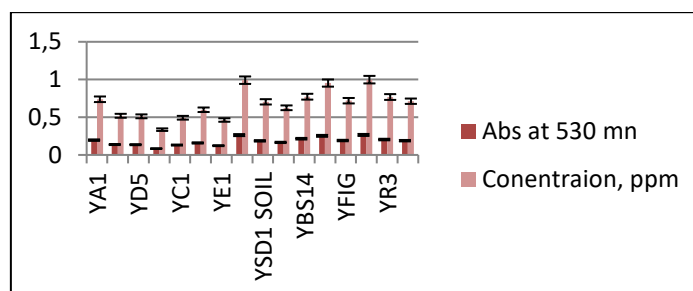
##### **4.2. Количествено определяне на индол-3-оцетна киселина чрез използване на реагент Salkowski**

За оценка на биосинтетичния потенциал на изследваните щамове по отношение на вторични метаболити с фитохормонална активност беше проведено дълбочинно култивиране на изследваните дрожди в присъствие на въглероден източник глюкоза, азотен източник дрождев екстракт и пептон и 0.2% триптофан. Вида и количеството на въглероден и азотен източник имат отношение към

производството на ауксини, и в частност на индол оцетната киселина. Установено е, че глюкозата и пептона повишават количеството на ИОК в културални течности от почвени изолати на *Pseudomonas* и *Rhizobium* (Jeyanthi, V., & Ganesh, P., 2013).

Получените резултати са показани на фигура 11. Най-добрите производители на ИОК са щамовете YP6, YR1 и YD4. Повечето от изследваните дрожди имат средна до ниско ниво на синтез на индол-3-оцетна киселина, когато в средата има 0.1% L-триптофан.

Синтезата на микробни фитохормони от дрождите е свързано със сигнални промени в корена и стимулиране растежа на растенията. Наличието на определен фитохормон в супернатанта на микробната култура не е достатъчно, за да докаже функционалната роля на тази молекула при нейното взаимодействие с растението. В редица изследвания се наблюдава корелация между растежа на растенията и концентрацията на хормоните измерени в културалната среда или в колонизираните растителни тъкани при провеждане на експерименти и *in situ* (Spaeren Stijn, 2015).



**Фигура 11.** Производство на индол-3-оцетна киселина в YPD среда, с 0,1% (w/v) L-триптофан, инкубира при 30°C и 150 грм за 5 дни.

Индол-3-оцетна киселина е първият открит растителен хормон; обаче, неговият биосинтетичен път на генетично ниво, остава неясно. Биосинтезата на индол-3-оцетна киселина в гъбичките не е добре достатъчно добре проучена. Предишни изследвания предполагат, че в растенията съществуват 4 пътя на биосинтеза на ИОК и бактерии (Patten, 1996; Mano, 2012). При дрождите ИОК е предложена като метаболит на *Trp* (Hazelwood, 2008), което беше потвърдено в по-късни проучвания при различни дрожди като *Saccharomyces uvarum* и *Saccharomyces carlsbergensis* (Shin, 1991).

### 3.2. Скрининг за разтваряне на неорганични фосфати

Фосфорът е един източниците на енергия, който често ограничава растежа на растенията поради своята слаба разтворимост и фиксиране в почвата. Трансформацията на неразтворими и фиксирани форми на фосфор в разтворими форми е важен аспект при повишаването на фосфора в почвата (Pande et al., 2017). Преобладаващи форми на органичен фосфор са фитатите (инозитол хекса- и пента-фосфати), които съставляват до 60% от почвения органичен фосфор. За да бъдат усвоени от растенията фитатите първо трябва да се дефосфорилират с фосфатази (Gyaneshwar et al. 2002; Singh & Satyanarayana 2011).

Киселинните фосфатази и фитази, синтезирани от ризосферни микроорганизми, участват в органичното разтваряне на фосфора в почвата (Thaller et al. 1995). Фосфат-солюбилизиращия индекс (PSI) на изследваните щамове се определя чрез качествен метод за анализ при използване на агар на Пиковская (PVK) и резултатите са представени в табл. 3, (Pikovskaya, 1948). Установено е, че пет щамата притежават висока (зона на солубилизация над 2 см) фосфат-солюбилизираща активност измерена като индекс на фосфат-солюбилизация (PSI) на щамовете култивирани на среда PVK (Таблица 3). Два от изследваните щамата YC1, YFIG1 не проявяват такава активност, както и контролния щам *S. cerevisiae* ATCC 9763. Най-висок индекс на разтваряне се наблюдава при YBS14 ( $2,83 \pm 0.134$ ), последвано от YE1 ( $2.76 \pm 0.095$ ) и YH15 ( $2,50 \pm 0.099$ ). Установената способност на три от изследваните щамове да подобрява разтворимостта на неорганични фосфати е важна характеристика на PGP-микроорганизмите.

**Таблица 3.** Индекс на фосфат-солюбилизация и качествено определяне на протеолитична активност и синтеза на сидерофори при изследваните щамата дрожди.

№	Име на изолат	Идентификация	Индекс на фосфат-солюбилизация като зона в mm (PSI)
1	YA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9,2±0,072
2	YC1	<i>Kazachstania unispora</i>	12,5±0,115
3	YD1	<i>Kazachstania unispora</i>	16,6±0,142

4	YD5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10,2±0,087
5	YD6	<i>Pichia acaiae</i>	Не е установена
6	YP6	<i>Pichia fermentans</i>	21,00±1,05
7	YE1	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	27,6 ± 0,09
8	YG1	<i>Pichia membranifaciens</i>	15,0±0,026
9	YS4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9,6±0,073
10	YSG1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16,0±0,138
11	YBS14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28,3 ± 0,134
12	YSW1	<i>Saccharomyces kudravzevii</i>	Не е установена
13	YFIG1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18,0±0,074
14	YR1	<i>Pichia membranifaciens</i>	22,0±0,085
15	YR3	<i>Kazachstania servazzii</i>	25,0 ± 0,099
16	YH15	<i>Kazachstania unispora</i>	17,6±0,034
17	Референтен щам	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Не е установена

Резултатите са представени, като средни стойности със стандартно отклонение (n = 3).  
Легенда: +++ зона > 30 mm, ++зона < 10-20 mm

### 3.4. Продукцията на сидерофори

Продукцията на сидерофори се свързва с формирането на разтворими Fe<sup>3+</sup> комплекси, които се включват в активния мембранен транспорт и могат да бъдат приети от растителните клетки (Gamit et al., 2014). Синтезата на сидерофори от дрождите в ризосферата води също и до затрудняване на достъпа до желязо на вредната микрофлора и се отчита като значима PGP характеристика (Deshwal and Kumar, 2013; Bholay et al., 2012). В настоящето изследване способността на щамовете да произвеждат сидерофори се определи върху течна и твърда среда след прибавяне на Chrome Azurol S съгласно Schwyn и Neilands (1987). Синтезът на сидерофори от дрождиите щамове се установи по промяна на цвета на хранителната среда (от синьо към червено-лилаво или жълто). Интересно е, че при щам YE1 показва по-висока активност на твърда хранителна среда, в сравнение с течна хранителна среда с CAS. Обратната активност се наблюдава при щам YP6. Най-активните продуценти на сидерофори са YD5, YD6, YE1, YP6, YBS14 (Таб. 4). Те бяха избрани за третиране на растенията и за проследяване на ефекта върху растежа и развитието на домати, пипер, патладжан и тютюн.

**Таблица 4. Качествено определяне на протеолитична активност и синтеза на сидерофори**

Номер	Име на изследвания щам	Идентификация	Протеолитична активност, измерена като зона на просветляване в mm	Синтеза на сидерофори като зона на промяна на цвета на твърда хранителна среда, зона в mm	Синтеза на сидерофори като зона на промяна на цвета на течна хранителна среда
1	YA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18,5	-	-
2	YD1	<i>Kazachstania unispora</i>	Не е установена	-	-
3	YD5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OL889951	35	+++	+++
4	YD6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	+++	+++
5	YC1	<i>Pichia acaiae</i>	Не е установена	-	-
6	YG1	<i>Pichia fermentans</i>	36	-	-
7	YE1	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> -OL904963	16,4	+++	++
8	YP6	<i>Pichia</i>	29,3	++	+++



		<i>membranifaciens</i>			
9	YSD1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20,3	++	-
10	YSW1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OL889954	32,5	++	+++
11	YBS14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43	+++	+++
13	YFIG1	<i>Saccharomyces kudravzevii</i>	38	+++	-
14	YR1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35	++	++
15	YR3	<i>Pichia membranifaciens</i>	27,6	+++	++
16	YH15	<i>Kazachstania servazzii</i>	38	+++	-
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Референтен щам	25	-	-

#### 4. Оценка на биоконтролните активности на работните щамове срещу тест-патогени микроорганизми.

Друга важна черта на PGPR, която може индиректно да повлияе върху растежа на растенията, е производството на сидерофори (Lungwi et al. 2016). Те се свързват с наличната форма на желязо  $Fe^{3+}$  в ризосферата, като по този начин го правят недостъпно за фитопатогените и защитават здравето на растенията (Miethke and Marahiel, 2007; Leong, 1986). В настоящото изследване сидерофорите, произведени от ендofитни дрожди *S. cerevisiae* YD5, *Z. bailii* YE1 и *S. kudravzevii* YSW1, показват противогъбична активност срещу мощните патогени на тютюна като *A. solani*, *R. solani* и *F. solani*. Сидерофорът, произведен от *S. cerevisiae* YD5, регистрира най-силното инхибиране срещу *F. solani*, следван от *S. kudravzevii* YSW1. *Z. bailii* YE1 потиска растежа на всички тествани гъбични патогени и проявява подобни действия срещу тях. Съобщава се, че *Zygosaccharomyces spp.* са много толерантни към условия с високо съдържание на захар и устойчиви на сулфит и сорбат на нива, които са инхибиторни за други дрожди и бактерии (Thomas and Davenport, 1985). Настоящото откритие доказва, че сидерофорите на дрождите са мощни агенти, които могат да се използват срещу растителни патогени Solanaceous. Тези резултати са в съответствие с Leong (1986) и разкриват, че микроорганизмите произвеждат сидерофори по време на ограничаващи желязото условия изолират желязо (III), като по този начин го правят недостъпно за патогена. През 2007 г. Miethke съобщи, че външното приложение на сидерофори използва желязо, като по този начин намалява наличието на желязо за патогена, като по този начин позволява убиването на растителния патоген. По-ранни констатации съобщават за използването на сидерофори за контролиране на няколко патогенни гъби като *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Phytophthora parasitica*, причиняващи болести по растенията (McCloughlin et al. 1992). Голяма група активни щамове дрожди са описани като агенти за биоконтрол поради тяхната комбинирана способност да произвеждат различни противогъбични метаболити (Tian et al. 2009; Lesuisse, 2001).

#### 4.1. Антагонистична активност на работните щамове срещу бактериални фитопатогени от род *Pseudomonas* и *Xanthomonas*.

*Pseudomonas syringae* се определя, като един от основните причинители на бактериални инфекции по домати, които причиняват сериозни загуби в добива. *Xanthomonas vesicatoria* причинява т. нар. бактериално петнисто заболяване с образуването на лезии по листата, стеблата и плодовете на пипер и домати, което също води до сериозно намаляване на добивите (Кyeon et al., 2016; Kizheva et al., 2011). Антагонистичната активност на изследваните дрожди срещу двата тест-фитопатогена е определена по метода на дифузия в агар и резултатите са представени на фигура 12. YBS14 и YP6 инхибират *Pseudomonas syringae*. YBS14 само показва антибактериална активност срещу *Xanthomonas vesicatoria*.





А)

*Pseudomonas syringae* като референтен щам

В) *Xanthomonas vesicatoria* като референтен щам

**Фигура 12.** Зони на инхибиране при тестваните щамове срещу *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas vesicatoria*.

#### 4.2. Антигъбна активност на изследваните щамове

Голяма група активни щамове дрожди са описани, като биоконтролни агенти в резултат на общата им способност да произвеждат различни антигъбни метаболити (таблица 4). Антигъбната активност на петте изследвани щама *Fusarium solani* и изчислените ефекти на инхибиране са представени на таблица 4.

От получените резултати може да се отбележи, че два щама YE1 и YBS14 напълно инхибира растежа на три от тестовите плесени *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* и *Alternaria solani*. Два щама (YA1, YC1) не показват потискащо действие върху трите тествани гъбни патогена. Те са слаби продуценти на литични ензими и не синтезират сидерофори. Останалите видове инхибират поне един от изследваните тест фитопатогенни гъби (Фиг. 13).

**Таблица 4.** Антигъбна активност на изследваните щамове

Номер	Име на изследвания щам	Антигъбна активност на изследваните щамове		
		<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Alternaria solani</i>
1	YA1	ND	ND	ND
2	YD1	+	+++	+++
3	YD5	+++	ND	ND
4	YD6	+++	ND	ND
5	YC1	ND	ND	ND
6	YG1	ND	ND	+++
7	YE1	+++	+++	+++
8	YP6	+++	+++	ND
9	YSD1 SOIL	+++	ND	ND
10	YSW1	ND	+++	+++
11	YBS14	+++	+++	+++
13	YFIG1	ND	ND	+++
14	YR1	ND	ND	+++
15	YR3	+++	ND	+++

+ слабо изразена антигъбна активност със зона на подтискане < 10 mm

+++ силно изразена антигъбна активност със зона на подтискане > 20 mm

ND - не е установена

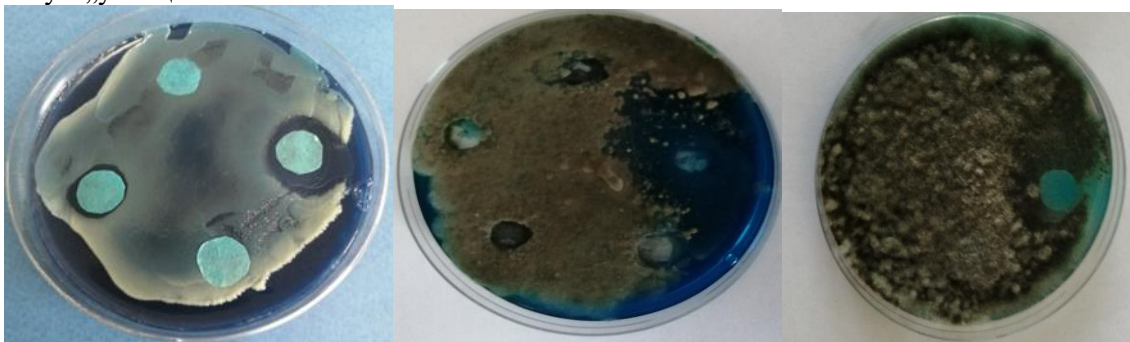


Фигура 13. Антигъбна активност на изследваните щамове срещу гъбни фитопатогени

#### 4.3. Скрининг за синтез на микоцини (ензими „убийци“)

YE1, YD5, YP6, YBS14, YSW1, YR1 показват инхибиране срещу *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizoctonia solani* и *Alternaria solani* (Фиг. 14). Някои заключения могат да бъдат направени, като всички щамове на *Pichia membranifaciens* и *Pichia fermentans* показват най-силните ефекти, инхибирайки всички тест-култури, използвани в това в това проучване. *P. membranifaciens* YR1 и *Zygosaccharomyces bailii* YE1 показват най-голям спектър на инхибиране сред всички дрожди изолати. *Zygosaccharomyces bailii* показва най-голям диаметър от 42 mm на инхибиране срещу определения щам на *Alternaria solani*

Инхибирането на гъбите не се наблюдава при третирането на безклетъчната супернатанта с протеоличини ензими, което потвърди факта, че докладваното инхибиране се свързва със синтез на ензим „убиец“.



A) *Saccharomyces cerevisiae*

B) *Alternaria solani*

C) *Rhizoctonia solani*

Фигура 14. А. Дрожди убийци срещу *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizoctonia solani* и *Alternaria solani*. В. *Zygosaccharomyces bailii* YE1 показват най-голям спектър на инхибиране сред всички гъбни изолати.

### 5. Провеждане на *in vivo* тестове с растения за проследяване ефекта на получените субстанции от изследваните щамове по отделно.

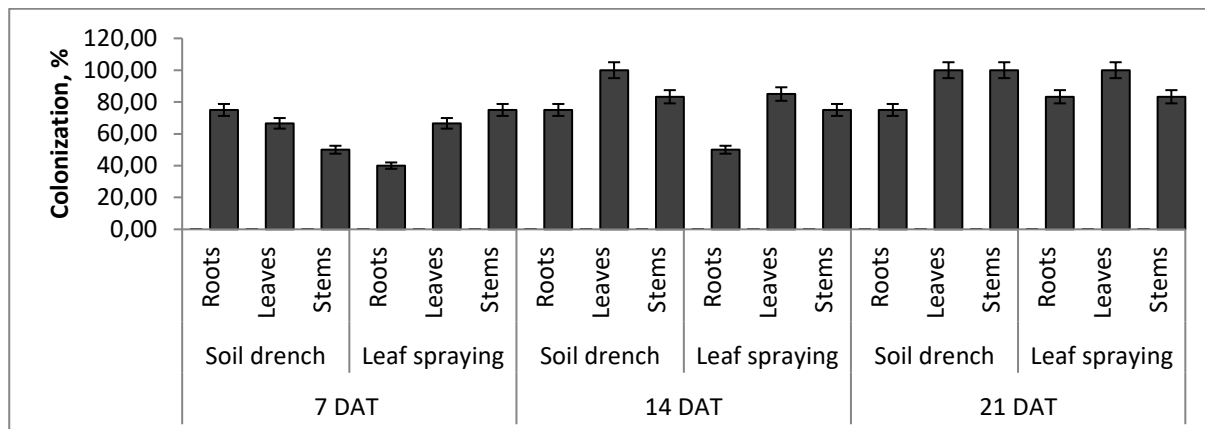
#### 5.1. Провеждане на съдови опити тестове с тютюн за проследяване ефекта на изследваните щамове по отделно.

Предходни проучвания показват, че степента на колонизация на корените е от решаващо значение за стимулиране на растежа, увеличаване на добивите и толерантност към биотичен и абиотичен стрес (Verma et al. 2001; Oelmüller et al. 2009).

За провеждане на опита са заложени общо 55 саксии с 3,5 л вместимост. Разсада е от сорт Крумовград 58 взет от лехи общо 25 растения са инокулирани почено, 25 листно и 5 контроли. За по-добро проследяване на третираните растения преди разсаждане са измерени корен и надземна част. След третиране на растенията са извършвани периодични измервания на надземна част и стъбло на определени интервали на 7ми, 14ти, 22ри, 29ти и 39ти. На 14 ден след първо третиране на част от растенията е направено и допълнително второ третиране (Фиг. 14).

При използване на техниката на почвена инокулация, най-високата честота на колонизация от 83,33% до 100% е отчетена за *S. cerevisiae* YD1 и *S. kudriavzevii* YSW1, докато *Z. bailii* YE1 има по-ниска степен (66,66%) на колонизация на тютюнев корен (Фигура 14). След обработката на данните, повишият процент на честота в листата и стъблата е впечатляващ, дори в инокулираните в почвата експериментални растения. Миграцията на дрожди както надолу, така и нагоре по течението е

доказана до 21 DAT, където процентът на колонизация в различни тъкани на третиран с почва и третиран с листа тютюневи растения е доста сходен.



**Фигура 14.** Процент на колонизация на тютюневи растения на ден 7 DAT, 14 DAT, 21 DAT с щамове дрожди, внесени чрез директно инокулиране в почвата и пръскане на листата. Данните са представени като средни аритметични стойности и лентите показват стойности на SD.

### 5.2. Проследяване на влиянието на ендифитните дрожди върху растежните параметри на тютюневите растения

Резултатите показват, че най-голям растеж на стъблото се наблюдава при третиран с почва растения със *S. kudriavzevii* YSW1. На 7 DAT бяха докладвани близки стойности при почвено и листно третиране на растежа на надземната част на растенията (Таблица 5). За разлика от тези данни, на 14 дни до 28 дни растенията с листно приложение на *S. cerevisiae* YD5 и *Z. bailii* YE1, поотделно, имат почти два пъти по-високо стъбло и произвеждат по-голяма биомаса. От докладваните данни за растежа на стъблото, измерен на 28 DAT, се забелязва, че третиран с почва растения със *S. kudriavzevii* YSW1 имат по-добри стойности от третиран с листа растения със същия щам. Най-голямото увеличение на стъблото беше открито при пръскани листа със *Z. bailii* YE1, последвано от пръскани листа със *S. cerevisiae* YD5. Най-дългата дължина на корена  $8,8 \pm 3,33$  cm е докладвана при третиран с почва (SD II) тютюневи растения със *S. cerevisiae* YD5, последвана от  $8,7 \pm 2,92$  cm на *S. kudriavzevii* YSW1. Най-дългата дължина на листа от  $20,7 \pm 5,11$  cm беше измерена при растения, третиран с SD-II със *S. kudriavzevii* YSW1, последвани от  $20,0 \pm 3,28$  cm, когато растенията бяха единично третиран с *Z. bailii* YE1 чрез разпръскване на листа. Най-високата стойност на листната биомаса е установена при същите щамове и методи на третиране.

**Таблица 5.** Влияние на биоконтролните дрожди върху растежните параметри на тютюневите растения. Тютюневите растения бяха третиран чрез напояване на почвата (SD) и пръскане на листа (LS) и бяха направени измервания на 28-ия DAT (I-първо третиране) и 14-ти DAT (II-второ третиране).

Щам	Третиране	Височина на стъбло $\pm$ SD, cm	Дължина на корен $\pm$ SD, cm	Дължина на лист $\pm$ SD, cm	Биомаса листа $\pm$ SD, g
Control	-	21.3 $\pm$ 4.21	4.80 $\pm$ 2.02	5.65 $\pm$ 3.23	3.63 $\pm$ 0.86
YD5	LS I	23.0 $\pm$ 5.48	7.25 $\pm$ 1.88	17.0 $\pm$ 3.82	7.6 $\pm$ 0.55
YD5	LS II	28.4 $\pm$ 5.32	10.5 $\pm$ 3.25	15.3 $\pm$ 3.54	3.7 $\pm$ 0.27
YD5	SD I	26.5 $\pm$ 2.94	5.8 $\pm$ 2.27	11.2 $\pm$ 2.09	3.2 $\pm$ 0.31
YD5	SD II	23.5 $\pm$ 3.26	8.8 $\pm$ 3.33	10.5 $\pm$ 2.51	4.6 $\pm$ 0.88
YE1	LS I	39.5 $\pm$ 4.82	5.5 $\pm$ 2.14	20.0 $\pm$ 3.28	15.3 $\pm$ 2.39
YE1	LS II	32.5 $\pm$ 3.07	7.5 $\pm$ 2.63	8.6 $\pm$ 1.38	10.5 $\pm$ 1.81
YE1	SD I	38.4 $\pm$ 3.85	8.0 $\pm$ 1.21	13.5 $\pm$ 3.99	4.9 $\pm$ 0.66
YE1	SD II	26.8 $\pm$ 4.66	8.5 $\pm$ 2.31	17.4 $\pm$ 3.87	6.0 $\pm$ 0.81
YSW1	LS I	18.0 $\pm$ 4.01	8.2 $\pm$ 2.19	7.5 $\pm$ 2.25	1.5 $\pm$ 0.02
YSW1	LS II	23.0 $\pm$ 4.23	7.1 $\pm$ 2.70	12.5 $\pm$ 3.13	3.6 $\pm$ 0.11
YSW1	SD I	37.5 $\pm$ 5.64	6.2 $\pm$ 2.92	14.5 $\pm$ 3.40	5.3 $\pm$ 0.45
YSW1	SD II	35.0 $\pm$ 6.58	8.7 $\pm$ 2.92	20.7 $\pm$ 5.11	11.5 $\pm$ 1.76

След първото третиране са наблюдавани най-високи стойности при листно пръскани растения с *Z. bailii* YE1 и *S. cerevisiae* YD5 (Таблица 3). Беше наблюдавано, че растенията, третирани със *S. kudriavzevii* YSW1, показват по-добри стойности при третиране на почвата, а растенията, третирани със *S. cerevisiae* YD5 и особено *Z. bailii* YE1, имат по-добър ефект при листно третиране и имат по-високи стойности от контролните растения (Таблица 6).

Таблица 6. Растеж на тютюневите растения по време на експерименталния период, наблюдавани на 7, 14 и 28 DAT (дни след третиране).

Щам	Третиране	Параметри	1-14 ден растеж, cm	15-28 DAT растеж, cm	Общ растеж, cm
<b>Controla</b>	No treatment	Mean	<b>7.52</b>	<b>3.26</b>	<b>10.78</b>
		SD	5.06	2.48	7.50
		VAR	25.63	615	56.23
		Var%	67.32	76.09	69.56
<b>YD5</b>	LS	Mean	<b>10.86</b>	<b>11.08</b>	<b>21.94</b>
		SD	7.89	4.72	12.21
		VAR	62.32	22.29	149.19
		Var%	72.69	42.61	55.67
<b>YD5</b>	SD	Mean	<b>8.50</b>	<b>2.66</b>	<b>11.16</b>
		SD	3.95	0.82	4.19
		VAR	15.63	0.67	17.59
		Var%	46.50	30.73	37.58
<b>YE1</b>	LS	Mean	<b>10.42</b>	<b>12.88</b>	<b>23.30</b>
		SD	5.54	6.36	11.88
		VAR	30.71	40.48	141.08
		Var%	53.18	49.40	50.98
<b>YE1</b>	SD	Average	10.10	2.80	12.90
		SD	5.45	1.37	6.38
		VAR	29.68	1.89	40.66
		Var%	53.94	49.03	49.43
<b>YSW1</b>	LS	Mean	<b>4.90</b>	<b>1.48</b>	<b>6.38</b>
		SD	3.83	0.75	3.95
		VAR	14.68	0.56	15.61
		Var%	78.18	50.65	61.92
<b>YSW1</b>	SD	Mean	<b>14.18</b>	<b>4.24</b>	<b>18.42</b>
		SD	6.92	1.43	8.06
		VAR	47.91	2.06	64.95
		Var%	48.81	33.83	43.75

Публикуваната информация за ендифитна колонизация от различни видове дрожди е ограничена. Joubert и Doty (2018) предполагат, че дрождите са в състояние да се движат в околната среда и да колонизират различни растения гостоприемници. Авторите дават провокираща размисъл хипотеза, за да обяснят колонизацията на дрождите е ролята на производството на IAA. Този хормон засяга корените на растенията, като инхибира диференциацията на клетките на корените на растенията и насърчава удължаването на корените. Въпреки че това не е доказано директно, като гъбички, свързани с растенията, ендифитните дрожди вероятно имат ензимните способности да разграждат стените на растителните клетки (Joubert and Doty, 2018). Настоящото проучване проследява спецификата на дрождите да колонизират определен растителен вид. Тютюнът принадлежи към семейство Solanaceae и изследваните щамове дрожди са изолирани главно от листата на пшеница и

ягоди. За установяване на тази способност е наблюдавана колонизацията на различни тъкани в корена, стъблото и листата на тютюна.

### 5.3. Ефекти на ендофитни дрожди върху физиологичните параметри на тютюневите растения

Много автори са показали, че значителните промени в съдържанието на фотосинтетични пигменти служат като адаптивна стратегия към различен тип екзогенен или ендогенен стрес (Joshi and Swami 2009; Wagh et al. 2006), така че ние имаме за цел да оценим въздействието на колонизацията на ендофитни дрожди по физиология и развитие на растенията. Нашите данни разкриха, че всички приложени шамове дрожди при всички видове обработки значително повишават концентрацията на фотосинтетични пигменти в тютюневите листа (Таблицы 7 и 8).

**Таблица 7.** Анализ за фотосинтетични пигменти в експериментални растения, третирани чрез напояване на почвата (SD) и пръскане на листа (LS) 14 дни след първото третиране като процент спрямо контролни растения.

Щам	Третиране	Концентрация $\pm$ SD, mg g <sup>-1</sup> свежа маса				Съотношение	
		chl a	chl b	chl a+b	car	chl a/b	chl a+b/car
Control	-	4.91 $\pm$ 1.3	2.86 $\pm$ 0.8	7.77 $\pm$ 2.1	1.94 $\pm$ 0.4	1.72	4.02
YD5	LS	14.40 $\pm$ 2.5	8.41 $\pm$ 1.7	22.81 $\pm$ 4.2	5.83 $\pm$ 1.6	1.71	3.91
YD5	SD	10.95 $\pm$ 2.0	6.32 $\pm$ 1.6	17.27 $\pm$ 3.6	4.12 $\pm$ 1.2	1.73	4.19
YE1	LS	11.24 $\pm$ 2.1	6.31 $\pm$ 1.6	17.55 $\pm$ 3.7	4.67 $\pm$ 1.2	1.78	3.76
YE1	SD	8.51 $\pm$ 1.8	5.13 $\pm$ 1.4	13.64 $\pm$ 3.2	3.46 $\pm$ 1.0	1.66	3.95
YSW1	LS	5.69 $\pm$ 1.5	3.25 $\pm$ 1.0	8.94 $\pm$ 2.5	2.14 $\pm$ 0.6	1.75	4.17
YSW1	SD	13.40 $\pm$ 2.3	8.24 $\pm$ 1.7	21.64 $\pm$ 4.0	5.13 $\pm$ 1.5	1.63	4.22

**Таблица 8.** Анализ за фотосинтетични пигменти в експериментални растения, третирани чрез напояване на почвата (SD) и пръскане на листа (LS) на 28 ден след първото третиране и 14 ден след второто третиране като процент спрямо контролни растения.

Щам	Третиране	Концентрация $\pm$ SD, mg g <sup>-1</sup> fresh weight				Съотношение	
		chl a	chl b	chl a+b	car	chl a/b	chl a+b/car
Control	-	5.67 $\pm$ 1.5	3.12 $\pm$ 0.9	8.79 $\pm$ 2.4	2.20 $\pm$ 0.5	1.82	3.99
YD5	LS I	6.75 $\pm$ 1.6	4.15 $\pm$ 1.2	10.90 $\pm$ 2.8	2.48 $\pm$ 0.5	1.63	4.39
YD5	LS II	7.31 $\pm$ 1.9	4.32 $\pm$ 1.3	11.63 $\pm$ 3.2	2.97 $\pm$ 0.6	1.69	3.92
YD5	SD I	10.93 $\pm$ 2.1	6.68 $\pm$ 1.7	17.62 $\pm$ 3.8	4.56 $\pm$ 1.3	1.64	3.87
YD5	SD II	8.73 $\pm$ 1.8	5.66 $\pm$ 1.5	14.39 $\pm$ 3.3	3.35 $\pm$ 1.0	1.54	4.29
YE1	LS I	6.96 $\pm$ 1.7	4.40 $\pm$ 1.3	11.37 $\pm$ 3.0	2.56 $\pm$ 0.6	1.58	4.45
YE1	LS II	9.70 $\pm$ 1.9	5.91 $\pm$ 1.5	15.61 $\pm$ 3.4	3.75 $\pm$ 1.0	1.64	4.17
YE1	SD I	8.49 $\pm$ 1.7	5.14 $\pm$ 1.4	13.63 $\pm$ 3.1	3.04 $\pm$ 0.9	1.65	4.48
YE1	SD II	9.30 $\pm$ 1.8	5.52 $\pm$ 1.5	14.81 $\pm$ 3.3	3.48 $\pm$ 1.0	1.69	4.26
YSW1	LS I	7.01 $\pm$ 1.7	4.30 $\pm$ 1.4	11.30 $\pm$ 3.1	2.56 $\pm$ 0.6	1.63	4.41
YSW1	LS II	4.49 $\pm$ 1.3	2.98 $\pm$ 0.8	7.47 $\pm$ 2.1	1.89 $\pm$ 0.3	1.51	3.94
YSW1	SD I	9.04 $\pm$ 1.8	5.95 $\pm$ 1.5	14.99 $\pm$ 3.3	3.67 $\pm$ 1.1	1.52	4.08
YSW1	SD II	11.10 $\pm$ 2.1	6.69 $\pm$ 1.8	17.79 $\pm$ 3.9	4.17 $\pm$ 1.2	1.66	4.26

Исключение беше установено само за щам *S. kudriavzevii* YSW1, където двулистното третиране доведе до най-ниски стойности както на съдържанието на пигменти, така и на съотношенията на пигменти (79 - 98% спрямо контролата). Повишеният синтез на хлорофил b е по-изразен във всички експериментални тютюневи растения, последван от този на каротеноидите. Като цяло, chl b се счита за по-податлив на абиотични влияния и по време на процеса на разграждане на хлорофила, chl b се превръща в chl a (Fang et al. 1998). От друга страна, каротеноидите изпълняват много важни физиологични функции в растенията: влияят върху механизмите на развитие и адаптация, което предполага координация на техния синтез в различни физиологични процеси, но най-вече служат като антиоксиданти срещу ендогенен и екзогенен оксидативен стрес, възникващ при намаляване на количеството на оксидантите в тялото или клетката надвишава тази на антиоксидантите (Sillanpaa et al. 2008). Въпреки това, съотношението хлорофил a/b и общото съотношение хлорофил/каротеноиди



поддържат подобни нива в сравнение с контролните тютюневи растения (съответно 83 - 92% и 90 - 106%).

Въз основа на тези открития може да се заключи, че няма инхибиторно въздействие върху здравния статус и физиологията на растенията, причинено от колонизацията на ендофитни щамове дрожди. Освен това те повишават фотосинтетичния потенциал, както и продуктивността на растенията, което е добре демонстрирано и от данни за мониторинг на скоростта на фотосинтеза (Таблицы 9 и 10).

**Таблица 9.** Фотосинтеза и скорост на транспирация в експериментални тютюневи растения, третиране чрез напояване на почвата (SD) и листно третиране (LS) на 14-ия ден след първото третиране.

Щам	Третиране	Интензивност на фотосинтеза $\pm$ SD, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Интензивност на транспирацията $\pm$ SD, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Проводимост на устицата $\pm$ SD, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Control	-	4.665 $\pm$ 2.28	0.648 $\pm$ 0.04	18.98 $\pm$ 3.78
YD5	LS	9.968 $\pm$ 3.31	0.648 $\pm$ 0.11	18.61 $\pm$ 3.64
YD5	SD	6.983 $\pm$ 2.76	0.601 $\pm$ 0.10	16.83 $\pm$ 3.52
YE1	LS	6.850 $\pm$ 2.56	0.552 $\pm$ 0.09	16.42 $\pm$ 3.49
YE1	SD	6.180 $\pm$ 2.39	0.644 $\pm$ 0.11	18.52 $\pm$ 3.63
YSW1	LS	8.054 $\pm$ 2.90	0.500 $\pm$ 0.08	14.31 $\pm$ 3.20
YSW1	SD	4.050 $\pm$ 2.12	0.274 $\pm$ 0.02	7.33 $\pm$ 2.81

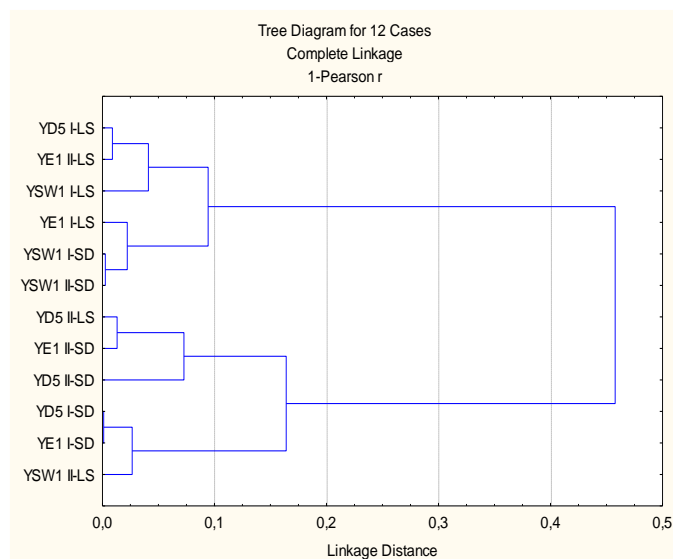
**Таблица 10.** Скорост на фотосинтеза и транспирация при опитни тютюневи растения – 28-ми ден след 1-во третиране, 14-ти ден след 2-ро третиране.

Щам	Третиране	Интензивност на фотосинтезата $\pm$ SD, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Интензивност на транспирацията $\pm$ SD, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Отваряне на устицата $\pm$ SD, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Control	-	12.086 $\pm$ 4.33	0.136 $\pm$ 0.01	4.14 $\pm$ 1.69
YD5	LS I	9.760 $\pm$ 2.30	0.377 $\pm$ 0.03	11.24 $\pm$ 3.09
YD5	LS II	10.154 $\pm$ 2.33	0.440 $\pm$ 0.03	13.84 $\pm$ 3.73
YD5	SD I	8.568 $\pm$ 2.28	0.396 $\pm$ 0.03	12.15 $\pm$ 3.33
YD5	SD II	10.356 $\pm$ 2.38	0.278 $\pm$ 0.02	8.35 $\pm$ 2.91
YE1	LS I	11.816 $\pm$ 3.14	0.418 $\pm$ 0.03	11.13 $\pm$ 3.22
YE1	LS II	16.188 $\pm$ 4.94	0.392 $\pm$ 0.03	10.43 $\pm$ 3.05
YE1	SD I	10.575 $\pm$ 2.32	0.289 $\pm$ 0.02	8.54 $\pm$ 2.93
YE1	SD II	10.388 $\pm$ 2.31	0.238 $\pm$ 0.02	6.96 $\pm$ 2.78
YSW1	LS I	12.626 $\pm$ 2.77	0.664 $\pm$ 0.04	15.65 $\pm$ 4.21
YSW1	LS II	9.654 $\pm$ 2.13	0.603 $\pm$ 0.04	14.31 $\pm$ 3.99
YSW1	SD I	11.014 $\pm$ 2.52	0.226 $\pm$ 0.02	5.34 $\pm$ 2.65
YSW1	SD II	15.231 $\pm$ 4.09	0.266 $\pm$ 0.02	6.34 $\pm$ 2.70

Периодичните измервания (след инокулация с щамове дрожди) на интензивността на фотосинтезата, транспирацията и устичната проводимост на експериментални тютюневи растения показват, че съвместното съществуване растение-дрожди не предизвиква стрес от първите 7 дни след третирането. Получените резултати кореспондират с констатациите на много автори, че адаптацията на растенията към екстремни стойности на който и да е фактор включва две основни реакции - избягване на стрес и/или устойчивост на стрес, и има три основни етапа. Първият етап включва първични стресови реакции, вторият етап е свързан с адаптивните реакции към стреса, дължащи се на антиоксидантната защитна система на растителните организми, а третият е свързан със загуба на тегло и смърт на растенията (Khanna et al. 2020). Най-значимо положително въздействие върху изследваните физиологични признаци оказва щамът *Z. bailii* YE1, следван от щамове *S. kudriavzevii* YSW1 и *S. cerevisiae* YD5.

Що се отнася до ефекта от пръскането на листата спрямо намокрянето на корените и ефекта от еднократното третиране спрямо двойното третиране, статистическата оценка на всички изследвани биометрични и физиологични параметри подчертава, че за щам *Z. bailii* YE1 най-ефективното е двукратното листно инокулиране, докато за *S. cerevisiae* YD5 е еднократно третиране на почвата и единичен лист, а за щам *S. kudriavzevii* YSW1 е двукратно третиране на почвата ( $p < 0,05$ ). Клъстерният анализ, базиран на изследваните параметри, потвърди, че експерименталните варианти с двойно пръскане на листата на щамове *S. kudriavzevii* YSW1 и *S. cerevisiae* YD5 не са подобни на

инокулираните с листа тютюневи растения (Фигура 16). Формират се две основни групи, като първата комбинира трите щамове, приложени чрез листово пръскане, и два почвено третирани варианта *S. kudriavzevii* YSW1, при които се наблюдава по-висок стимулиращ ефект. Втората група се състои от останалите щамове дрожди, напоени с почва, и два пъти пръскани листа *S. cerevisiae* YD5 и *S. kudriavzevii* YSW1 щамове, където подобрението е по-слабо изразено ( $p < 0,05$ ).



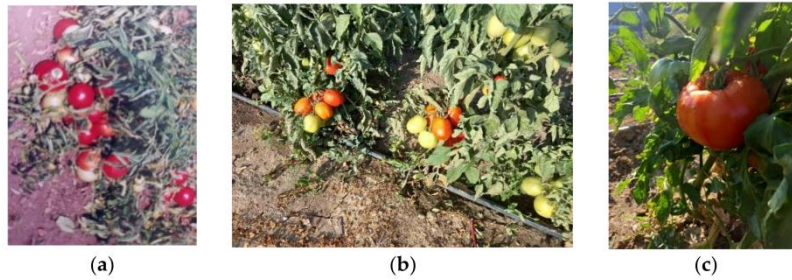
**Фигура 16.** Клъстерен анализ на базата на всички изследвани биометрични и физиологични параметри.

Широко известно е, че съдържанието на хлорофил в листата е важен параметър за тестване на състоянието на растението: то може да се използва като индекс на фотосинтетичния потенциал, както и на продуктивността на растението. Фотосинтетичният процес е един от първите, които се нарушават при настъпване на стрес в тъканите на растенията. Данните от периодичните наблюдения върху съдържанието на фотосинтетичните пигменти и техните съотношения, както и върху интензивността на фотосинтезата, транспирацията и устичната проводимост ясно показват, че три изследвани ендифитни щамове на дрожди могат да се използват като биоагенти, стимулиращи растежа в тютюневите насаждения. Освен това, тяхната положителна функция не се ограничава само до развитието на растенията, но те проявяват силно противогъбично действие. Болестите по растенията, причинени от гъбични патогени, са отговорни за големи загуби на реколта в световен мащаб. Дрождите показват висок потенциал да бъдат използвани като алтернативна стратегия за управление на гъбични заболявания при тютюна.

#### 7.5. Провеждане на съдови опити с домати, пипер и патладжан за проследяване ефекта на изследваните щамове (YBS14 и YP6) по отделно.

##### 7.6.

Растителният материал, използван в тази работа, се състои от три вида на домати, а именно СОЕ0158-местен домати джудже; СОЕ0159-детерминантен сорт „Пикадор“; СОЕ0160-индетерминантен сорт „Идеал“, запазен в генбанката на Института по растителни генетични ресурси, Садово. Местният домати джудже СОЕ0158 е компактен, с височина на растението до 40-50 cm, листа тип картофи, яркочервени плодове с плоска кръгла форма, с тегло на отглежданите домати 100-120 g. Детерминантният сорт „Пикадор“ е високопродуктивен сорт, произвеждащ плодове с наситено червена плът и е чудесен за консерви. От тях се получават хубави, леко продълговати домати, които по форма наподобяват круши, твърди и твърди, с тегло 50-60 g. Те се развиват на гроздове и благодарение на тяхната устойчивост на счупване, културите винаги са с високо качество и устойчиви на мухъл. Индетерминантният сорт „Идеал“ е средно ранен сорт домати с едри плодове 130–180 g, плоско-кръгли до кръгли, леко ръбести, многокамерни, оранжево-червени на цвят, с приятен вкус. Примерните изображения, представляващи типове „местно джудже“, „Пикадор“ и „Идеал“, използвани в това изследване, са показани на Фигура 17.



**Фиг. 17.** Изображения, представлящи различните видове домати, използвани в тази статия: (a) „местно джудже“, (b) „Пикадор“ и (c) „Идеал“.

Моделите са разработени на базата на флуоресцентни спектроскопски данни с помощта на ML алгоритми бяха използвани за разграничаване на неинокулирани (контролни) и инокулирани с дрожди проби от домати. Дискриминационният анализ е извършен поотделно за всеки от трите вида домати. Резултатите са посочени в Таблица 12, средната точност на дискриминацията на контролния и инокулирания домати достигна 100% за моделите, разработени с помощта на Hoeffding Tree от групата на дърветата и Bayes Net от групата на Bayes. И двете неинокулираните и инокулираните с дрожди домати бяха напълно разграничени от всеки друго и не е имало смесване на дела между класовете. В допълнение, друго изпълнение мерките показват пълна диференциация между инокулирани с дрожди и неинокулирани домати. Стойностите на скоростта на TP, прецизността, ROC зоната, PRC зоната, F-мярката и MCC бяха равни на 1000. Останалите алгоритми също дадоха много задоволителни резултати. Средна точност за модели, изградени с помощта на PART (група от правила), филтриран класификатор (група на Meta), IBk (група на Lazy) и Logistic (група на функциите) достигна 95%. В случай че всеки алгоритъм, контролните проби бяха правилно дискриминирани 100% от времето, докато инокулираните проби бяха дискриминирани с точност от 90%, а останалите 10% от случаите на домати, принадлежащи към действителния клас „инокулирани“, са включени неправилно в предвидения клас „контрол“. Получените матрици на объркване повлияха на по-ниски стойности на другите показатели за ефективност на дискриминацията. Коефициентът на TP беше равен на 1.000 за контролата и 0,900 за инокулирани проби в случая на всеки алгоритъм. Контролът и инокулираните дрожди домати се характеризират с точност, равна съответно на 0,909 и 1,000. Най-ниската стойност на площта на PRC е 0,909 за контролните домати за PART и алгоритми за филтриран класификатор. В случай на PART, Filtered Classifier, IBk и Logistic, стойността на F-мярката е равна на 0,952 за контролните проби и 0,947 за инокулирани проби и MCC достигна 0,905 и за двете проби от домати.

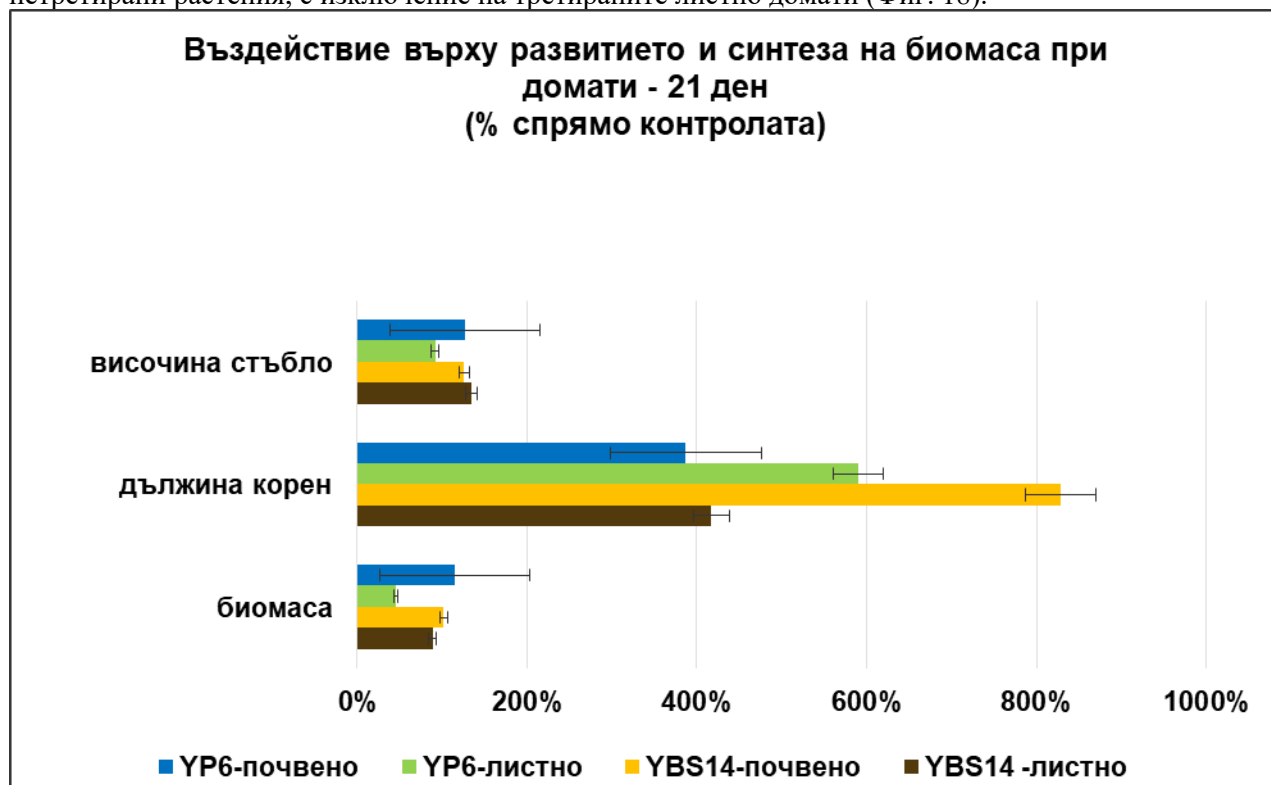
**Таблица 12.** Дискриминацията на контролния и инокулирания с дрожди домати.

Algorithm	Predicted Class (%)		Actual Class	Average Accuracy (%)	TP Rate	Precision	ROC Area	PRC Area	F-Measure	MCC
	Control	Inoculated								
trees.HoeffdingTree	100	0	control	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	0	100	inoculated		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
rules.PART	100	0	control	95	1.000	0.909	0.950	0.909	0.952	0.905
	10	90	inoculated		0.900	1.000	0.950	0.950	0.947	0.905
meta.FilteredClassifier	100	0	control	95	1.000	0.909	0.950	0.909	0.952	0.905
	10	90	inoculated		0.900	1.000	0.950	0.950	0.947	0.905

Algorithm	Predicted Class (%)		Actual Class	Average Accuracy (%)	TP Rate	Precision	ROC Area	PRC Area	F-Measure	MCC
	Control	Inoculated								
lazy.IBk	100	0	control	95	1.000	0.909	0.990	0.982	0.952	0.905
	10	90	inoculated		0.900	1.000	0.990	0.983	0.947	0.905
functions.Logistic	100	0	control	95	1.000	0.909	1.000	1.000	0.952	0.905
	10	90	inoculated		0.900	1.000	1.000	1.000	0.947	0.905
bayes.BayesNet	100	0	control	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	0	100	inoculated		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

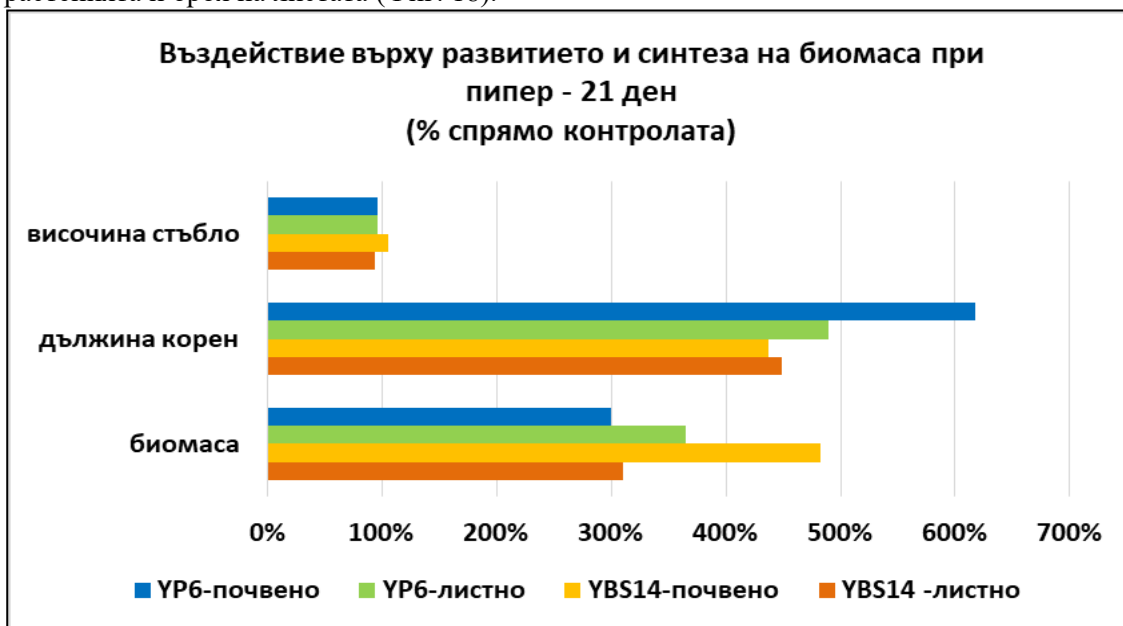
TP rate—true positive rate; ROC area—receiver operating characteristic area; PRC area—precision-recall area; MCC—Matthews correlation coefficient.

Доматите, пипера и патладжана, третирани по-същия начин както тютюна, като се използваха се два щамове дрожди YBS14 и YP6. На 21 ден след третиране се направи биометрична характеристика на ефекта на изследваните щамове дрожди върху растежа и развитието на домати, пипер и патладжан. При домати щам YBS14, приложен листно и почвено, показва стимулиращо влияние върху растежа на стъбло и корен. И двата щамове имат приложени почвено стимулират растежа на корена и латералните корени. Биомасата на надземна част (стъбло и листа) е по висока в сравнение контролите нетретирани растения, с изключение на третирани листно домати (Фиг. 18).



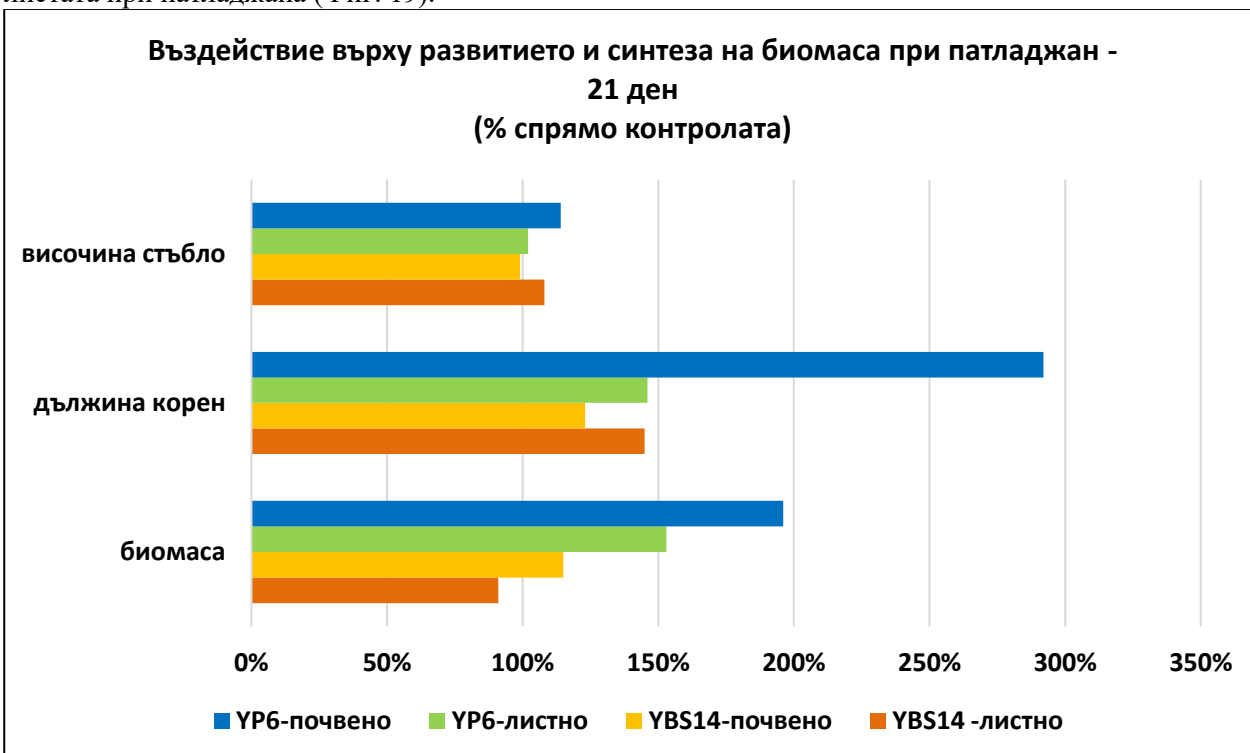
Фигура 18. Биометрия на домати за проследяване ефекта от третирането с изследваните щамове YBS14 и YP6.

При пипер се наблюдава слабо вариране във височината на надземната маса, но трикратно нарастване на корените в сравнение с контролата (2,7 cm), след третиране с двата щама дрожди и при двата начина третиране (12,3 до 16,6 cm). Това води до повишаване на биомасата на надземната част на растенията и броя на листата (Фиг. 18).



**Фигура 18.** Биометрия на пипер за проследяване ефекта от третирането с изследваните щамове YBS14 и YP6.

При патладжана почвеното третиране с шам Р6 показва най-добър ефект върху биометричните показатели на растенията на 21 ден. В контраст на резултатите с YP6, почвеното третиране с другия изследван шам YBS14 показва най-слабо стимулиране на растежа на стъбло, корени и биомасата на листата при патладжана (Фиг. 19).



**Фигура 19.** Биометрия на патладжан за проследяване ефекта на изследваните щамове (YBS14 и YP6) по отделно.

### 7.7. Въздействие върху фотосинтетичния процес и транспирацията

Данните от наблюденията върху интензивността на фотосинтезата, транспирацията и проводимостта на устицата са представени на таблица 7. По отношение на интензивността на фотосинтезата почти при всички експериментални варианти се отчита по-висока скорост 21 дни след

третирането със съответните микроорганизми. При коренова инокулация се отчита по-силно изразен отговор в сравнение с листното приложение на изолатите ( $p < 0,05$ ). При техния анализ и интерпретация следва да се отчита единствено въздействието на ендофитните микроорганизми, тъй като експериментът е проведен при еднакви условия. На 7 ден след инокулация (месец юни) най-високи стойности на интензивност на фотосинтезата са отчетени при почвено-третирания вариант с инокулат YP6 листно и почвено при патладжан, следвано от листно третираните домати с YBS14, в сравнение с контролните нетретираните растения. Най-ниски стойности при третиране на домати с YP6 и YBS14. На 21 ден след инокулация (месец юли) се запазва същия резултат като при YP6 листно и почвено при патладжан интензивността на фотосинтезата е повишена три пъти спрямо контролта.

По отношение на проводимостта на устицата и интензивността на транспирацията се установяват по-високи стойности на 21 ден след инокулация почти при всички изследвани варианти (табл. 11). Този факт доказва, че след третирането растенията изпитват стрес и затова са ограничили транспирацията си чрез затваряне на устичните клетки. Затварянето на устицата, освен до намаляване на транспирацията и подобряване на ефективността на използване на водата, води и до ограничаване на дифузията на  $\text{CO}_2$  през листата. Това от своя страна е допълнителна причина за намаляване на фотосинтетичната дейност, но въпреки това при растения от сем. *Salanaceae*, 21 дни след инокулация (месец юни), фотосинтетичната активност остава по-висока (Evans & Loreto 2000; Medrano et al. 2002, 2009; Flexas & Medrano 2002; Flexas et al. 2008, 2016).

Ефектът върху фотосинтезата може да е пряк, поради намален достъп на  $\text{CO}_2$  вследствие затваряне на устицата и нарастване на мезофилното съпротивление (Flexas et al., 2002), а също така и вследствие на промени във фотосинтетичния метаболизъм (Lawlor and Cornic, 2002).

**Таблица 11.** Интензивност на фотосинтезата ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), проводимост на устицата ( $G_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) и интензивност на транспирацията ( $E$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) при различните експериментални варианти на 7-ми и 21-ве ден след третиране на домати, пипер и патладжан с шамовете YBS14 и YP6.

Растение	Дни след третиране (DAT)	Шам дрожди	Начин на третиране на растенията	Фотосинтеза, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Проводимост на устицата, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Интензивност на транспирация, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
домати	7TH DAT	Контрола	-	8,444	0,678	73,71
		YBS14	Листно	12,039	0,149	16,94
		YBS14	Почвено	6,813	0,145	14,73
		YP6	Листно	9,717	0,511	71,03
		YP6	Почвено	6,787	0,358	44,51
	21ST DAT	Control	-	3,384	0,296	38,23
		YBS14	Листно	4,901	0,133	16,74
		YBS14	Почвено	3,189	0,321	48,28
		YP6	Листно	6,489	0,191	18,69
		YP6	Почвено	1,368	0,132	12,79
пипер	7TH DAT	Контрола	-	15,153	1,11	14,16
		YBS14	Листно	8,922	0,183	19,06
		YBS14	Почвено	11,509	0,163	18,39
		YP6	Листно	8,635	0,146	15,27
		YP6	Почвено	11,723	0,221	23,5
	21ST DAT	Контрола	-	2,937	0,098	11,68
		YBS14	Листно	8,671	0,26	36,88
		YBS14	Почвено	4,209	0,107	12,64
		YP6	Листно	8,924	0,156	17,67
		YP6	Почвено	7,301	0,188	23,74
патладжан	7TH DAT	Контрола	-	9,096	0,417	43,01
		YBS14	Листно	8,937	0,371	49,07
		YBS14	Почвено	11,681	0,596	96,01
		YP6	Листно	16,31	0,848	146,97



		YP6	Почвено	18,831	0,622	83,61
	21ST DAT	Контрола	-	3,03	0,11	12,31
		YBS14	Листно	7,09	0,438	74,41
		YBS14	Почвено	4,502	0,293	40,97
		YP6	Листно	11,578	0,227	27,65
		YP6	Почвено	13,474	0,158	17,82

### Изводи

- Новоизолираните щамове са охарактеризирани чрез физиолого-биохимични и молекулярно-генетични изследвания.
- При двата начина на инокулиране се наблюдава колонизация всички части на растението. Това свидетелства за способността на пет от изследваните дрожди (*S. cerevisiae* YD1, *S. kudriavzevii* YSW1, *Z. bailii* YE1, *P. fermentans* YP6 и *S. cerevisiae* YBS14 да се придвижват низходящо и възходящо в растенията.
- Клетките на дрождите най-често са разположени в междуклетъчното пространство на клетките в корена на растенията. Изключение прави изолат YP6, който е открит в цитоплазмата на клетките.
- *S. cerevisiae* YD1, *S. kudriavzevii* YSW1, *Z. bailii* YE1, *P. fermentans* YP6 и *S. cerevisiae* YBS14 са способни на ендофитна колонизация на тютюна, без да увреждат тъканите му.
- Дрождите могат да синтезират физиологично активни вещества (индол-3-оцетна киселина, сидерофори, микоцини) и да стимулират растежа на растенията, да намалят патогенната инфекция, както и биотичния и абиотичния стрес. Доказана е способността на изследваните щамове да повишават мобилността на фосфора, синтезират индол-3-оцетна киселина и сидерофори.
- Установена е антимикуробната активност на щамове дрожди срещу бактериални и гъбни фитопатогени. При *Z. bailii* YE1, *P. fermentans* YP6 и *S. cerevisiae* YBS14, антимикуробната активност се дължи на отделянето на микоцини.
- Ендофитните дрожди имат стимулиращ ефект върху фотосинтезата, устичната проводимост и интензитета на транспирация. Фотосинтезата почти при всички експериментални варианти се отчита по-висока скорост 21 дни след третирането със съответните дрождиеви инокулати. При измерване на проводимостта на устицата и интензивността на транспирацията се установяват по-високи стойности при почти всички изследвани варианти спрямо контролните растения.
- *S. cerevisiae* YD1, *S. kudriavzevii* YSW1, *Z. bailii* YE1, *P. fermentans* YP6 и *S. cerevisiae* имат висок потенциал да бъдат използвани като агент за биоконтрол в земеделието на тютюна.

### Литература

- Alori, E. T. and Babalola, O. O. **2018**. Microbial Inoculants for Improving Crop Quality and Human Health in Africa. *Frontiers in microbiology*, 9, 2213. doi: 10.3389/fmicb.2018.02213
- Aly, A. H., Debbab, A. and Proksch, P. **2011**. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1829–1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>
- Bachmann, L.; Zezell, D.M.; Ribeiro, A.D.C.; Gomes, L.; Ito, A.S. Fluorescence Spectroscopy of Biological Tissues—A Review. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, 41, 575–590.
- Brooks, D. S., Gonzalez, C. F., Appel, D. N., and Filer, T. H. **1994**. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological-control agents for Oak Wilt. *Biological Control*, 4(4), 373-381.
- Calvente V., Benuzzi D., de Tosetti M. S. **1999**. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International biodeterioration & biodegradation*, 43 (4), 167-172.
- Castanheira M., Deshpande L. M., Davis A. P., Rhomberg P. R., Pfaller M. A. **2017**. Monitoring Antifungal Resistance in a Global Collection of Invasive Yeasts and Molds: Application of CLSI Epidemiological Cutoff Values and Whole-Genome Sequencing Analysis for Detection of Azole Resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 22;61(10):e00906-17. <http://doi: 10.1128/AAC.00906-17>.
- Celis Zambrano C., Moreno Duran, G., Sequeda-Castañeda L. G., García Caicedo A., Albarracín D. M., Barreto Charry L. C. **2014**. Determining the effectiveness of *Candida guilliermondii* in the biological control

of *Rhizopus stolonifer* in postharvest tomatoes. *Universitas Scientiarum*, 19 (1), 51-62. doi: 10.11144/Javeriana.SC19-1.debc

Chaiharn M., Chunchaleuchanon S., Kozo A., Lumyong S. **2008**. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *Current Applied Science and Technology*, 8 (1), 18-23.

Dakin, J.P.; Brown, R. *Handbook of Optoelectronics: Concepts, Devices, and Techniques (Volume One)*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017.

Das, A., Prasad, R., Srivastava, A., Giang, P. H., Bhatnagar, K., Varma, A. **2007**. Fungal siderophores: structure, functions and regulation. In *Microbial siderophores* (pp. 1-42). Springer, Berlin, Heidelberg.

De Simone, N., Capozzi, V., Amodio, M. L., Colelli, G., Spano, G., Russo, P. **2021**. Microbial-based Biocontrol Solutions for Fruits and Vegetables: Recent Insight, Patents, and Innovative Trends. *Recent Pat Food Nutr Agric.*; 12(1):3-18. doi: 10.2174/2212798412666210125141117.

Deng, Z., Wang, W., Tan, H., Cao, L. **2012**. Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapeseed (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica* spp. in metal-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut* 223(8):5321– 5329. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1282-6>

Deshwal, V. K., and Kumar, P. **2013**. Production of Plant growth promoting substance by *Pseudomonads*. *J Acad Ind Res.*, 2(4), 221-225.

Dhankher, O. P., Pilon-Smits, E. A. H., Meagher, R. B., Doty, S. **2012**. 20—biotechnological approaches for phytoremediation A2—Altman, Arie. In: Hasegawa PM (ed) *Plant biotechnology and agriculture*. Academic Press, San Diego, pp 309–328.

Doty, S. L. **2013**. Endophytic yeasts: biology and applications. In *Symbiotic endophytes* (pp. 335-343). Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-39317-4\_17.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., Glick, B. R. **2014**. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125.

Duponnois, R., Colombet, A., Hien, V., Thioulouse, J. **2005**. The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. *Soil Biol Biochem* 37:1460– 1468.

Eid, A. M., Fouda, A. Abdel-Rahman, M. A., Salem, S. S., Elsaied, A., Oelmüller, R., Hijri, M., Bhowmik, A., Elkelish, A., Hassan, S. E. D. **2021**. Harnessing Bacterial Endophytes for Promotion of Plant Growth and Biotechnological Applications: An Overview. *Plants*, 10, 935. <https://doi.org/10.3390/plants10050935>

El-Zohri, M., Medhat, N., Saleh, F. E. M., and El-Maraghy, S. S. **2017**. Some biofertilizers relieved the stressful drawbacks of calcareous soil upon black seed (*Nigella sativa* L.) through inhibiting stress markers and antioxidant enzymes with enhancing plant growth. *Egyptian Journal of Botany*, 57(1), 75-92.

Fang, Z., Bouwkamp, J., Solomos T. **1998**. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, 49: 503-510.

Fernandez-San Millan A, Farran I, Larraya L, Ancin M, Arregui LM, Veramendi J. **2020**. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. *Microbiol Res.* 237:126480. doi: 10.1016/j.micres.2020.126480. Epub 2020 Apr 26. PMID: 32402946.

Ferraz, R. B., Kabeya, N., Lopes-Marques, M., Machado, A. M., Ribeiro, R. A., Salaro, A. L., Ozório, R., Castro L. F. C., Monroig, Ó. **2019**. A complete enzymatic capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis is present in the Amazonian teleost tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 227, 90-97.

Firriacieli, A., Otilar, A., Salamov, J., Schmutz, Z., Khan, R. S. Redman, N. D., Fleck, E., Lindquist, I. V., Grigoriev, Doty, S. L. **2015**. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic yeast *Rhodotorula graminis* WP1. *Frontiers in Microbiology*, 6, 978.

Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., Migheli, Q. **2019**. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 1-19.

Fu, S. F., Sun, P. F., Lu, H. Y., Wie, J. Y., Xiao, H. S., Fang, W. T., Chou, J. Y. **2016**. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* L. *Fungal biology*, 120(3), 433-448. doi: 10.1016/j.funbio.2015.12.006

Gamit, D. A., Tank, S. K. **2014**. Effect of siderophore producing microorganism on plant growth of *Cajanus cajan* (Pigeon pea). *Int J Res Pure Appl Microbiol*, 4(1), 20-27.

Ghosh, S. K., Bera, T., Chakrabarty, A. M. **2020**. Microbial siderophore—A boon to agricultural sciences. *Biological Control*, 144, 104214.

Gizaw, B., Tsegay, Z., Tefera G., Aynalem, E. **2017**. Phosphate solubilizing yeast isolated and characterized from teff rhizosphere soil collected from gojam, Ethiopia. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*, 5, 218-223.

Golubev, W. I., Pfeiffer, I., Golubeva, E. W. **2006**. Mycocin production in *Pseudozyma tsukubaensis*. *Mycopathologia*, 162(4), 313-316.

- Goodell, B., Winandy, J. E., Morrell, J. J. **2020**. Fungal degradation of wood: Emerging data, new insights and changing perceptions. *Coatings*, *10* (12), 1210.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., Poole, P. S. **2002**. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil*, *245*(1), 83-93.
- Hallmann, J, Berg, G, Schulz, B. **2007**. Isolation procedures for endophytic microorganisms. Springer Brelin Heidelberg, New York.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., W.Kloepper, J. **1997**. Bacterial endophytes in agricultural crops, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 43, no. 10, pp. 895–914.
- Hassan, S. E. D. **2017**. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *J Adv Res*, *8*, 687–695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J., Pronk, J. T., Dickinson, J. R. **2008**. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and environmental microbiology*, *74*(8), 2259-2266.
- Hernández-Fernández, M., Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M., Cantoral, J.M. **2021**. Culturable Yeasts as Biofertilizers and Biopesticides for a Sustainable Agriculture: A Comprehensive Review. *Plants*, *10*, 822. <https://doi.org/10.3390/plants10050822>
- Hernandez-Montiel, L.G.; Droby, S.; Preciado-Rangel, P.; Rivas-García, T.; González-Estrada, R.R.; Gutiérrez-Martínez, P.; Ávila-Quezada, G.D. **2021**. A Sustainable Alternative for Postharvest Disease Management and Phytopathogens Biocontrol in Fruit: Antagonistic Yeasts. *Plants*, *10*, 2641. <https://doi.org/10.3390/plants10122641>
- Hider, R.C. and Kong, X. **2010**. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.*; *27*:637–657. doi:10.1039/b906679a.
- Hoffmann, A.M.; Noga, G.; Hunsche, M. Fluorescence indices for monitoring the ripening of tomatoes in pre- and postharvest phases. *Sci. Hortic.* **2015**, *191*, 74–81.
- Isaeva, O. V., Glushakova, A. M., Garbuz, S. A., Kachalkin, A. V., Chernov, I. Y. **2010**. Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biology Bulletin*. February 9; *37*(1):26-34. doi:10.1134/S1062359010010048
- Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. **2002**. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology*, *40*(1), 411-441. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158
- Jijakli, M. H. and Lepoivre, P. **1998**. Characterization of an exo- $\beta$ -1, 3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, *88*(4), 335-343. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.4.335
- Joshi, P. C. and Swami, A. **2009**. Air pollution induced changes in the photosynthetic pigments of selected plant species. *J Environ Biol.* *30*(2): 295-298.
- Joubert, P. M. and Doty, S. L. **2018**. Endophytic yeasts: Biology, ecology and applications. *Endophytes of forest trees*, 3-14.
- Karoui, R.; Blecker, C. Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems—A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2011**, *4*, 364–386.
- Khalil, A.M.A., Hassan, S. E.-D., Alsharif, S. M., Eid, A. M.; Ewais, E. E.-D., Azab, E. Gobouri, A. A.; Elkelish, A., Fouda, A. **2021**. Isolation and Characterization of Fungal Endophytes Isolated from Medicinal Plant *Ephedra pachyclada* as Plant Growth-Promoting. *Biomolecules*, *11*, 140. <https://doi.org/10.3390/biom11020140>
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for sustainable development*, *27*(1), 29-43.
- Khanna, K.; Kapoor, D.; Sharma, P.; Bakshi, P.; Sharma, P.; Saini, P.; Ohri, P.; Mir, B.A.; Kaur, R.; Bhardwaj, R. **2020**. Plant-Microbe Interactions under Adverse Environment. In *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I*; Springer: Singapore,; pp. 717–751.
- Koza, J.R.; Bennett, F.H.; Andre, D.; Keane, M.A. Automated Design of Both the Topology and Sizing of Analog Electrical Circuits Using Genetic Programming. In *Artificial Intelligence in Design '96*; Gero, J.S., Sudweeks, F., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1996; pp. 151–170.
- Kurtzman, C. P. and Robnett C. J. **1998**. Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, *73*, 331-371.
- Kurtzman, C. P. edited by Cletus P.; Fell, Jack W.; Boekhout, Teun. **2011**. The yeasts: a taxonomic study (5th ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Leong, J. **1986**. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, *24*:187–209. doi:10.1146/annurev.py.24.090186.001155.
- Lesuisse, E., Blaiseau, P. L., Dancis, A., Camadro, J. M. **2001**. Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, *147*(2), 289-298.

- Ling, L., Tu Y., Ma, W., Feng, S., Yang, C., Zhao, Y., Zhang, J. **2020**. A potentially important resource: endophytic yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 1-7. doi: 10.1007/s11274-020-02889-0
- Liu, Y. Y., Chen, H W., Chou, J. Y. **2016**. Variation in Indole-3-Acetic Acid Production by Wild *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* Strains from Diverse Ecological Sources and Its Effect on Growth. *PLOS ONE* 11(8): e0160524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160524>
- Lyngwi, N. A., Nongkhlaw, M., Kalita, D., Joshi, S. R. **2016**. Bioprospecting of Plant Growth Promoting Bacilli and Related Genera Prevalent in Soils of Pristine Sacred Groves: Biochemical and Molecular Approach. *PLOS ONE* 11(4): e0152951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152951>
- Mcloughlin, T. J., Quinn, J., Bettermann, A., Bookland, R. **1992**. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilts fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Applied and environmental microbiology*. 58. 1760-3. 10.1128/AEM.58.5.1760-1763.1992.
- Mercado-Blanco, J. and Lugtenberg, B. J. J. **2014**. Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Current Biotechnology*, 3, 60-75. <http://dx.doi.org/10.2174/22115501113026660038>.
- Miethke, M. and Marahiel, M.A. **2007**. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 71:413–451. doi:10.1128/MMBR.00012-07.
- Mitchell, T.M. Machine learning and data mining. *Commun. ACM* **1999**, 42, 30–36. 37.
- Mitschke, F.; Mitschke, F. *Fiber Optics*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016.
- Mukherjee, A., Verma, J. P., Gaurav, A. K., Chouhan, G. K., Patel, J. S., Hesham, A. E. **2020**. Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 104(4):1497-1510. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10321-3>.
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., Sivasithamparam K. **2005**. Promotion of plant growth by an auxin producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*. July 1, 42(2):97-108.
- Nutaratat, P., Amsri, W., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., Limtong, S. **2015**. Indole-3-acetic acid production by newly isolated red yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *J Gen Appl Microbiol.*; 61: 1–9. doi: 10.2323/jgam.61.1 P
- Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., Limtong S. **2014**. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biol.*, 118(8):683–694. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.04.010>
- Oelmüller, R., Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A. **2009**. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis*, 49:1–17.
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., Kaushik, S. **2017**. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379-391.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., Hatziloukas, E. **2020**. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Petkova, M., Spasova-Apostolova, V., Masheva, V., Tahsin, N. **2020**. Comparison of Endophytic Colonization of Bulgarian Variety of Tobacco by Entomopathogenic Fungi - *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii* . *Ecologia Balkanica*, Vol. 12, Issue 1 June 2020 pp. 31-40.
- Petrini, O., and Fisher, P. J. **1986**. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. *Transactions of the British Mycological Society*, 87, 647–651. doi:10.1016/S0007-1536(86)80109-7
- Petrova, S. **2020**. Efficiency of *Pinus nigra* J.F. Arnold in removing pollutants from urban environment (Plovdiv, Bulgaria). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(31): 39490-39506.
- Pikovskaya, R. I. **1948**. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- Punja, Z. K., Utkhede, R. S. **2003**. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 21(9):400-407.
- Rao, R. P.; Hunter, A., Kashpur, O., Normanly, J. **2010**. Aberrant Synthesis of Indole-3-Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* Triggers Morphogenic Transition, a Virulence Trait of Pathogenic Fungi. *Genetics*, 185, 211–220.
- Raza, M., Ghazanfar, M. U., Hussain, M., Iqbal, Z., and Iftikhar, Y. **2013**. Pathogenic and non-pathogenic fungi isolated from soil and roots of tobacco. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 25(1), 95-100.
- Rima, H., Steve, L., Ismail, F. **2012**. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3, 421.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. **2006**. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19 (8), 827-837.
- Sabel, A., Bredfeldt, S., Schlander, M., Claus, H. **2017**. Wine phenolic compounds: Antimicrobial properties against yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Beverages*, 3(3), 29.

- Saharan, B. S., and Nehra V. **2011**. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
- Saligkarias, I. D., Gravanis, F. T., Epton H. A. **2002**. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. A study on mode of action. *Biological Control*, 25(2), 151-161.
- Schulz B, Boyle C, Sieber TN, editors. **2006**. Microbial Root Endophytes. Berlin: Springer Verlag; p. 367.
- Schwyn, B., Neilands, J. B. **1987**. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Shin, M., Shinguu, T., Sano, K., Umezawa, C. **1991**. Metabolic Fates of L-Tryptophan in *Saccharomyces uvarum*: *Saccharomyces carlsbergensis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 39 (7), 1792-1795.
- Shukla, S. T., Habbu, P. V., Kulkarni, V. H., Jagadish, K. S., Pandey, A. R., Sutariya, V. N. **2014**. Endophytic microbes: a novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. *Asian J Pharmacol Toxicol*, 2(3), 1-6.
- Sillanpää, S., Salminen J.P., Lehikoinen, E., Toivonen, E., Eeva, T. **2008**. Carotenoids in a food chain along a pollution gradient. *The Science of the Total Environment*, 406: 247-255.
- Singh, B., Satyanarayana, T. **2011**. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, 17(2), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0062-x>
- Spaepen, S. **2015**. Plant hormones produced by microbes. In Principles of plant-microbe interactions (pp. 247-256). Springer, Cham.
- Spaepen, S., and Vanderleyden, J. **2011**. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438. doi: 10.1101/cshperspect.a001438
- Statsoft. Inc. 2004 STATISTICA (data analysis software system) Version 7.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Stępniewska, Z., Kuźniar, A. **2013**. Endophytic microorganisms—promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(22), 9589-9596.
- Sun, P. F., Fang, W. T., Shin, L. Y., Wie, J. Y., Fu, S. F. **2014**. Indole-3-Acetic Acid-Producing Yeasts in the Phyllosphere of the Carnivorous Plant *Drosera indica* L. *PLOS ONE* 9(12): e114196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114196>
- Thaler, P. and Pagès L. **1998**. Modelling the influence of assimilate availability on root growth and architecture. *Plant and soil*, 201(2), 307-320.
- Thomas ,D. S., Davenport, R. R. **1985**. *Zygosaccharomyces bailii*-a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, 2, pp. 157-169.
- Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L., Du, B. **2009**. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 276-284.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K. **2001**. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of biotechnology*, 91(2-3), 127-141.
- Wagh, N. D., Shukla, P. V., Tambe, S. B., Ingle S. T. **2006**. Biological monitoring of roadside plants exposed to vehicular pollution in Jalgaon city. *Journal of Environmental Biology* 27(2): 419-421.
- Walker, G. M., Mcleod, A. H., Hodgson, V. J. **1995**. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS microbiology letters*, 127(3), 213-222.
- Xin, G, Glawe, D, Doty S. **2009**. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid producing yeast occurring in populus trees. *Mycological Research.*; 113:973-980.
- Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., Li, J., Li, X., Wang, J. **2008**. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1), 68-72.

## РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

5. **Участие с доклад на тема** :“Endophytic colonization of *Solanaceae* family plants by fungal entomopathogen *beauveria bassiana* strain 339 to control colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* SAY)“ **на** Юбилейната научна конференция с международно участие „75 години Аграрен университет – Пловдив – Перспективи пред аграрната наука и иновации за устойчиви продоволствени системи”, която ще се проведе в Пловдив, България през периода 26 - 28 ноември 2020 г.
6. **Участие с доклад на тема** на тема „*Solanaceae* plants growth-promoting and antifungal activities of two endophytic yeast strains“ на 32th ANNUAL MEETING AAIC (Bologna - Italy, 5-8 September 2021).

**Статии и доклади, публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (SCOPUS, WEB OF SCIENCE)-3**

1. Mariana K. Petkova, Velichka V. Spasova-Apostolova, Veselina B. Masheva, Nurettin T. Tahsin Comparison of Endophytic Colonization of Bulgarian Variety of Tobacco by Entomopathogenic Fungi - *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii* . *Ecologia Balkanica* 2020, Vol. 12, Issue 1 June 2020 pp. 31-40.
2. Petkova, M.; Petrova, S.; Spasova-Apostolova, V.; Naydenov, M. Tobacco Plant Growth-Promoting and Antifungal Activities of Three Endophytic Yeast Strains. *Plants* **2022**, *11*, 751. <https://doi.org/10.3390/plants11060751>

#### Цитирания-2

- Ropelewska, E.; Slavova, V.; Sabanci, K.; Aslan, M.F.; Masheva, V.; Petkova, M. Differentiation of Yeast-Inoculated and Uninoculated Tomatoes Using Fluorescence Spectroscopy Combined with Machine Learning. *Agriculture* **2022**, *12*, 1887.
- Liu, L.; Lin, W.; Zhang, L.; Tang, X.; Liu, Y.; Lan, S.; Wang, S.; Zhou, Y.; Chen, X.; Wang, L.; Chen, X.; Guo, L. Changes and Correlation Between Physiological Characteristics of *Rhododendron simsii* and Soil Microbial Communities Under Heat Stress. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*, 950947.
3. Ropelewska, E.; Slavova, V.; Sabanci, K.; Aslan, M.F.; Masheva, V.; Petkova, M. Differentiation of Yeast-Inoculated and Uninoculated Tomatoes Using Fluorescence Spectroscopy Combined with Machine Learning. *Agriculture* **2022**, *12*, 1887. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111887>
  4. Mariana Petkova, Velichka Spasova-Apostolova, Slaveya Petrova, and Veselina Masheva. Biosynthetic and biocontrol potential of endophytic yeast strains YP6 and YBS14 for improvement the growth and development of *Solanaceae* plants. Under submission in *Microbiology* special edition (IF: 4.926, ISSN: 2076-2607)