



АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ЦЕНТЪР ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ, ТРАНСФЕР НА ТЕХНОЛОГИИ И ЗАЩИТА
НА ИНТЕЛЕКТУАЛНАТА СОБСТВЕНОСТ

Пловдив 4000; бул. Менделеев № 12; e-mail: nic_au_plovdiv@abv.bg

Тел. +359/32/654420; 654427, www.au-plovdiv.bg

AGRICULTURAL UNIVERSITY - PLOVDIV
Bulgaria, 4000 Plovdiv, 12 Mendleev Str., e-mail: nic_au_plovdiv@abv.bg
Tel. +359/32/654420; 654427, www.au-plovdiv.bg

Информационен лист
за научните проекти, финансирани целево от държавния бюджет
ОТЧЕТ

за извършената работа по научноизследователски проект 01-20

Тема: „Изолиране и характеризиране на ендofитни микроорганизми и перспективи за
приложението им в биологичното земеделие“

(Втора финансова година)

Научен колектив:
Катедра „Микробиология и екологични биотехнологии“ 1. Ръководител на проекта: гл. ас. д-р Мариана Петкова
2. Членове от Катедра „Микробиология и екологични биотехнологии“ доц. д-р Младен Найденов гл. ас. д-р Славея Петрова Антония – Лучия Въжарова – студент специалност ЛГ, фак. № 7049
Институт по тютюн и тютюневи изделия - Марково, Секция по селекция и семепроизводство ас. д-р Величка Спасова - Апостолова

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Заложени задачи за втора експериментална година

1. Молекулярно- генетично охарактеризиране на щамове дрожди.
2. Изследване на основни активности при избраните щамове 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.
3. Тестване потенциала на изследваните щамове за биоконтрол при тест патогенни микроорганизми.
3. Провеждане на тестове тютюн (*Nicotiana tabacum* L.) за проследяване ефекта на получените субстанции от изследваните щамове по отделно.

ОСНОВНИ РЕЗУЛТАТИ

1. Молекулярно генетична характеристика

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.

Изолирана е тотална ДНК от всеки щам, която се амплифицира, чрез използване на универсални праймери за идентификация на еукариотни микроорганизми. За всеки дрождиен 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 дрожди от отдел *Saccharomycota* (Табл. 1).

Таблица 1. Молекулярно-генетична идентификация на изследваните дрождиени щамове на базата на секвенционен анализ.

Идентификация	Изследвани изолати				
	YD5	YE1	YSW1	YP6	YBS14
Идентификация	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ниво на сходство, %	100	100	100	100	100
Присъединителен номер в ген банката (Gene bank)	OL889951	OL904963	OL889954	MZ798453	MZ798454

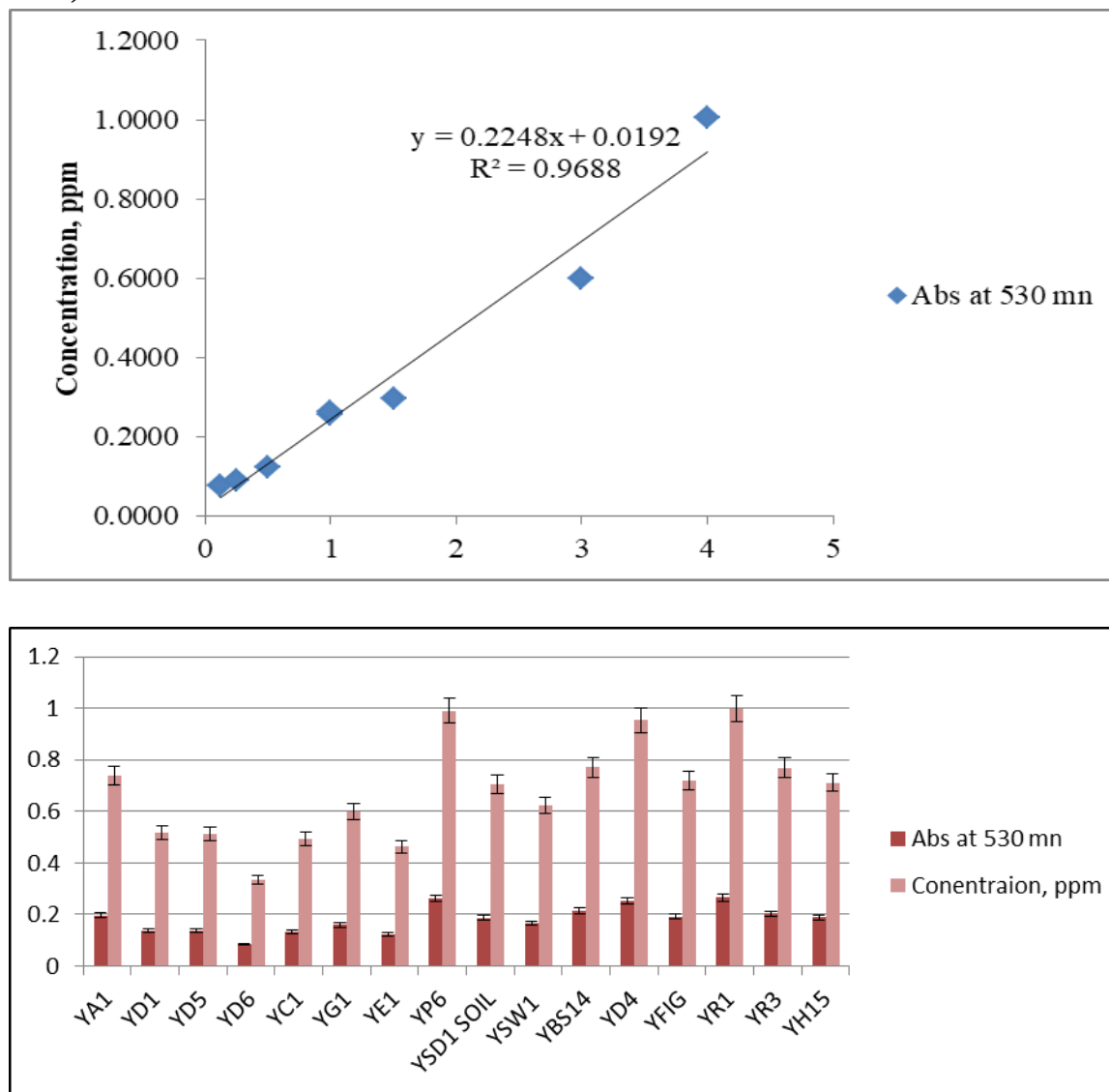
2. Характеристики определящи щамовете, като микроорганизми подпомагащи растежа и развитието на растенията (PGPR). Биосинтетичен потенциал на изследваните щамове.

2.1. 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, пептон и 0.2% триптофан. Вида и количеството на въглероден и азотен източник имат отношение към производството на ауксини, и в частност на индол 3-оцетната киселина. Установено е, че глюкозата и пептона повишават количеството на ИОК в културални течности от почвени изолати на *Pseudomonas* и *Rhizobium* (Jeyanthi & Ganesh, 2013).

Получените резултати са показани на фигура 2. Най-добрите производители на ИОК са щамовете YP6, YR1 и YD4. Повечето от изследваните дрожди имат средна до ниско ниво на синтез на ИОК, 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 колонизирани растителни тъкани при провеждане на експерименти *in situ* (Sraeren, 2015).



Фигура 2. Производство на индол-3-оцетна киселина в YPD среда, с 0,1% (w/v) L-триптофан от изследваните дрожди.

ИОК е първият открит растителен хормон; обаче, неговият биосинтетичен път на генетично ниво, остава неясно. Биосинтезата на индол-3- оцетна киселина от гъбите не добре проучена. Предишни изследвания предполагат, че в растенията съществуват 4 пътя на биосинтеза на ИОК при бактериите (Patten, 1996). Гъбната ИОК е предложена като метаболит на триптофана (Hazelwood, 2008), което беше потвърдено в по-късни проучвания и 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).

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



Фигура 3. Зони, получени от фосфат-солубилизацията (PSI) от изследваните дрожди при култивиране среда PVK.

Таблица 2. Индекс на фосфат-солубилизация и качествено определяне на протеолитична активност и синтеза на сидерофори при изследваните щамове дрожди.

Резултатите са представени, като средни стойности със стандартно отклонение ($n = 3$).

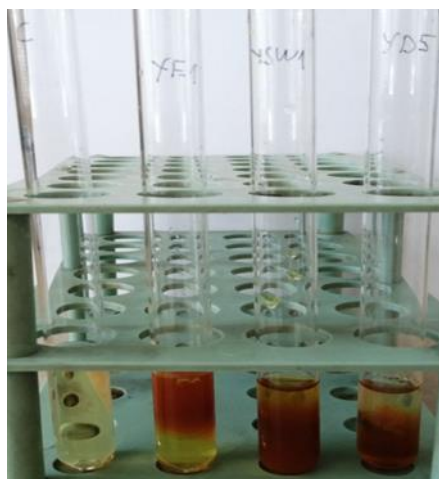
Номер	Име на изследвания щам	Индекс на фосфат-солубилизация (PSI) като зона в mm	Протеолитична активност, измерена като зона на просветляване в mm	Синтеза на сидерофори като зона на промяна на цвета на твърда хранителна среда в mm	Синтеза на сидерофори като зона на промяна на цвета на течна хранителна среда
1	YA1	$9,2 \pm 0.072$	18,5	-	-
2	YD1	$12,5 \pm 0.115$	Не е установена	-	-
3	YD5	$16,6 \pm 0.142$	35	+++	+++

4	YD6	10,2±0.087	15	+++	+++
5	YC1	Не е установена	Не е установена	-	-
6	YG1	21,00±105	36	-	-
7	YE1	27,6 ± 0.19	16,4	+++	++
8	YP6	15,0±0,026	29	++	+++
9	YSD1 SOIL	9,6±0.073	20,3	++	-
10	YSW1	16,0±0.138	32,5	-	+++
11	YBS14	28,3 ± 0.134	43	+++	+++
13	YFIG1	Не е установена	38	+++	-
14	YR1	18,0±0.074	35	++	-
15	YR3	22,0±0.085	27,6	+++	-
16	YH15	25,0 ± 0.099	38	+++	-
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Не е установена	25	-	-

Легенда: +++ зона > 30 mm, ++зона < 20 mm

2.2. Скрининг за производство на NH_3

Постигнат е значителен напредък в увеличаването на изследванията, които показват, че растежът на растенията може да бъде засилен от дрождите. Корените на растенията се колонизират от разнообразна популация от ендофитни микроорганизми, включително полезни бактерии и плесенни гъби. Някои от техните положителни ефекти могат да се дължат на осигуряването на разтворими хранителни вещества, които могат да допринесат директно за растежа на растенията и да действат като биостимуланти. Производството на NH_3 е много важна PGP характеристика на микроорганизмите. В настоящите експерименти YD5, YE1 и YSW1 показват способности за производство на амоняк когато се култивират на среда с пептон (Фигура 4).



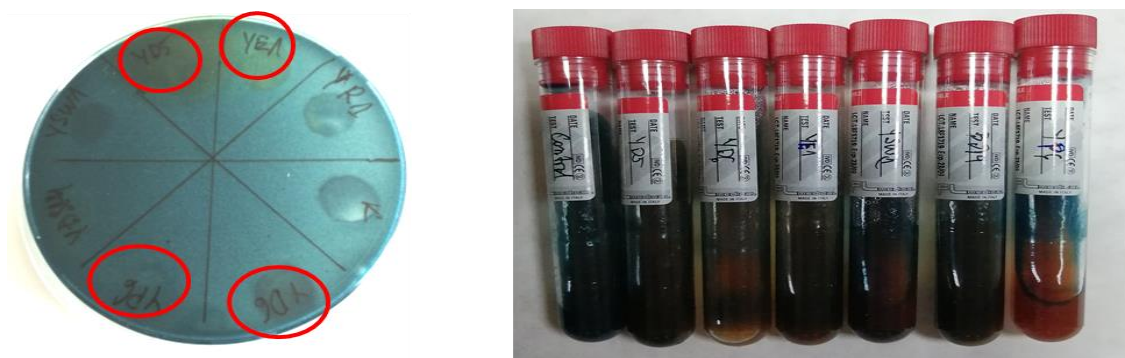
Фигура 4. Скрининг за производство на NH_3 .

2.3. Скрининг за производство на сидерфори и протеолитична активност

Производството на сидерфори е свързано с образуването на разтворими Fe^{3+} комплекси, които участват в активния мембранен транспорт и могат да бъдат получени от растителните клетки (Gamit et al. 2014). Синтезът на сидерфори от дрожди в ризосферата води до нарушен достъп на желязо до вредната микрофлора и се отчита като значима характеристика на PGP (Deshwal and Kumar, 2013). В настоящото изследване, способността на щамове да

произвеждат сидерофори се определя върху течна и твърда среда след добавяне на Chrome Azurol S според Schwyn и Neillands (1987). Синтезът на сидерофори от шамове дрожди се установява чрез промяна в цвета на хранителната среда (от синьо към червено-оранжево или жълто) (Фигура 5). Интересно е, че шамът YE1 и YD5 показва по-висока активност върху твърда среда в сравнение с течна среда с CAS. YSW1 активно произвежда сидерофор, когато се култивира в течна среда, но по-слаба активност в твърда среда (Таблица 2). Интересно е, че при шам YE1 показва по-висока активност на твърда хранителна среда, в сравнение с течна хранителна среда с CAS (Фигура 5). Обратната активност се наблюдава при шам YP6. Най-активните продуценти на сидерофори са YD5, YD6, YE1, YP6, YSW1 и YBS14. Пет от тях, YD5, YE1, YP6, YSW1 и YBS14, бяха избрани за третиране на растенията и за проследяване на ефекта върху растежа и развитието на тютюн.

Производството на сидерофори е често срещана характеристика на ендофитните дрожди, която е била значително изучавана при ендوفити по трайните култури, ориз и захарна тръстика (Nutaratat et al. 2014). Това е добре известно и при епифитните дрожди, които предотвратяват развалянето на плодовете (Nutaratat et al. 2014).



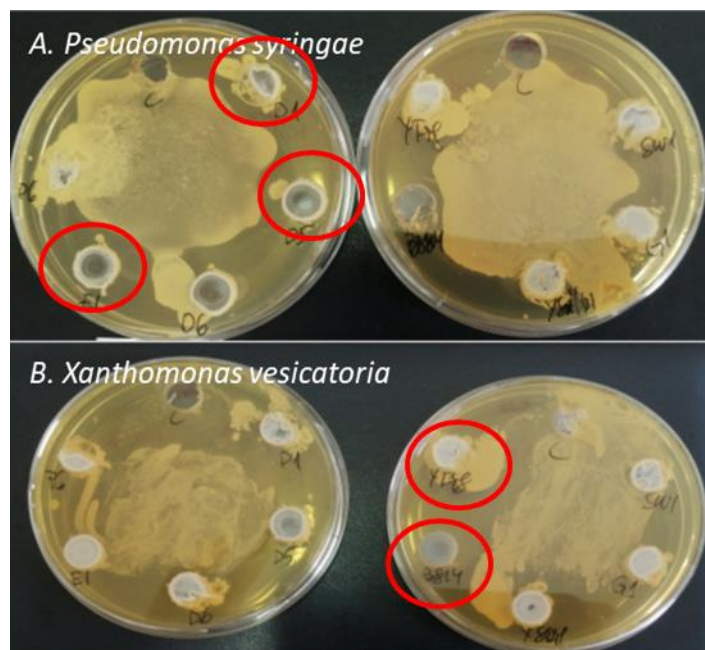
Фигура 5. Скрининг за производство на сидерофори от изследваните дрожди.

Микроорганизмите имат различен механизъм на инхибиране на патогена чрез производството на унищожавачи клетъчната стена протеолитични ензими. Активността на извънклетъчната протеаза се открива *in vitro* чрез формирането ясни зони на просветляване върху среда с обезмаслено мляко. Резултатите показват, че всички шамове произвеждат протеаза (Таблица 2). Най-високата протеолитична активност със 35 mm зона беше измерена, когато е приложен шам YD5 на *S. cerevisiae*, последвано от 32,5 mm зона от шам *S. kudravzevii* YWS1 оцветяване. В сравнение с тях *Z. bailii* YE1 показва двукратно намаление на протеолитичния капацитет.

3. Оценка на биоконтролните активности на работните шамове срещу тест - патогени микроорганизми.

3.1. Антагонистична активност на работните шамове 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, стъблата и плодовете на пипер и домати, което също води до сериозно намаляване на добивите (Kyeon 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 6.



Фигура 6. Зони на инхибиране при тестваните щамове срещу *Pseudomonas syringae* (A) и *Xanthomonas vesicatoria* (B).

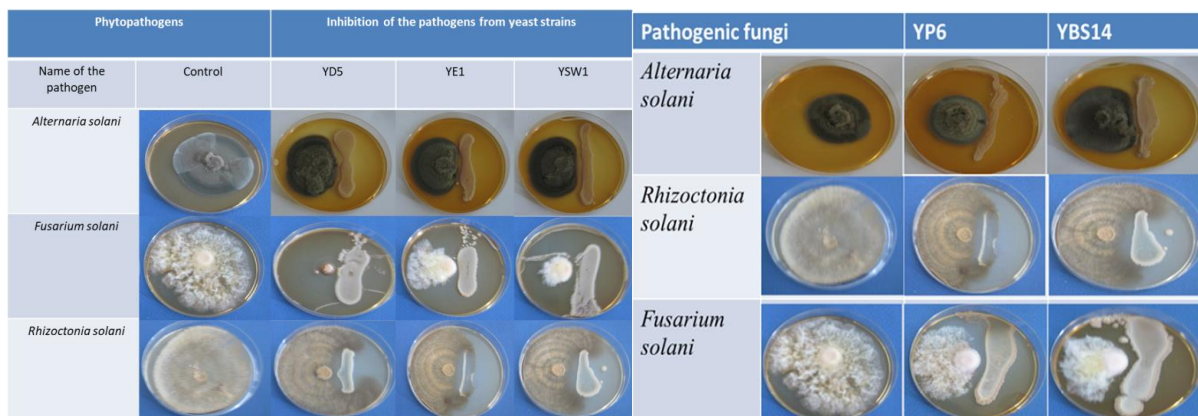
3.1. Антигъбна активност на изследваните щамове

Голяма група активни щамове дрожди са описани, като биоконтролни агенти в резултат на общата им способност да произвеждат различни антигъбни метаболити. Антимикробната активност на петте изследвани дрождиеви щамове срещу *Fusarium solani* и изчислените ефекти на инхибиране са представени на фигура 7 А и В.

От получените резултати може да се отбележи, че два щамове YE1 и YBS14 напълно инхибират растежа на три от тестовите плесени *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* и *Alternaria solani*. Два щамове (YA1, YC1) не показват потискащо действие върху трите тестовани гъбни патогена (Таблица 3). Те са слаби продуценти на литични ензими и не синтезират сидерофори. Останалите видове инхибират поне един от изследваните тест фитопатогенни гъби.

A.

B.



Фигура 7. Антимикробна активност на изследваните дрожди срещу плесенни гъби от род *Fusarium*, *Rhizoctonia* и *Alternaria*

Таблица 3. Антигъбна активност срещу плесенни гъби от род *Fusarium*, *Rhizoctonia* и *Alternaria*, измерена в зона на инхибиране в mm.

Номер	Име	на	Антигъбна активност на изследваните щамове
-------	-----	----	--

	изследвания щам	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Altenaria 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

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

YE1, YD5, YP6, YBS14, YSW1, YR1 показват инхибиране срещу *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* и *Altenaria solani* (Фиг. 8). Някои заключения могат да бъдат направени, като всички щамове на *Pichia membranifaciens* YR1 и *Pichia fermentans* YP6 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 подтискане на избраните три фитопатогенни гъби сред всички дрожди изолати. *Z. bailii* YE1 показва най-голям диаметър от 42 mm на инхибиране срещу определения щам на *Altenaria solani*.

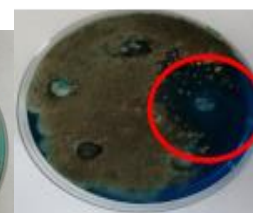
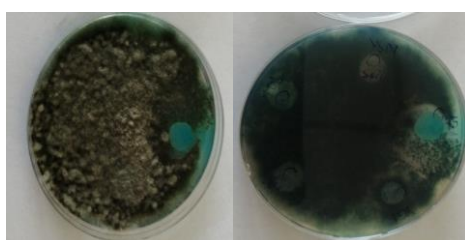
Инхибирането на гъбите не се наблюдава при третирането на безклетъчната супернатанта с протеоличини ензими, което потвърди факта, че докладваното инхибиране може да се свърже със синтез на ензим „убиец“.

A.

B.



Rhizoctonia solani



Altenaria solani

Фиг. 8. А. Синтез на микоцини от изследваните дрожди и тяхната активност срещу *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* и *Altenaria solani*.

В. Спектър на инхибиране на *Z. bailii* YE1 срещу *Altenaria solani*.

4. Провеждане на *in vivo* тестове с растения за проследяване ефекта на получените

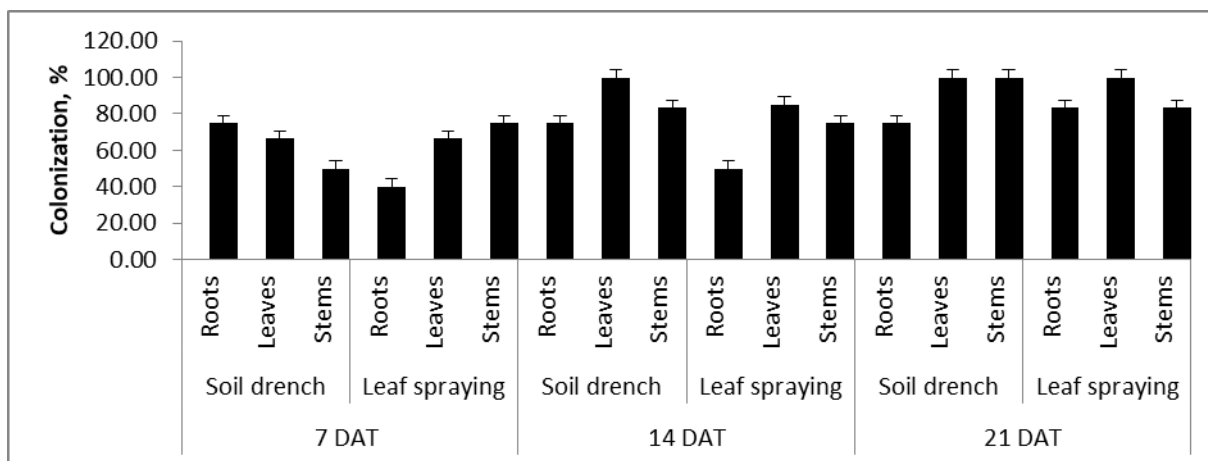
субстанции от изследваните щамове по отделно.

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

Ограничена информация относно ендофитната природа и взаимодействието между дрождите и растенията е необходима, за да се изясни дали дрождите показват специфичност към растителните видове.

Тютюнът е член на семейство *Solanaceae* и, от една страна, би могъл да отговори на въпроса дали дрождите имат ендофитен характер и показват ли специфични за вида предпочитания. За установяване на колонизацията на различните тъкани на тютюна, проби от корени, стъбло и листа бяха взети от почвата и третираните с листа растения на 14-ия ден след инокулацията (Фигура 9).

При използване на техниката на почвена инокулация, най-висока честота на колонизация от 83,33% до 100% е отчетена за *S. cerevisiae* YD5 и *S. kudriavzevii* YSW1, докато *Z. bailii* YE1 има по-ниска степен (66,66%) на колонизация на тютюневите корени. След обработка на данните, по-високият процент на честота в листата и стъблата е впечатляващ, дори при инокулираните в почвата опитни растения. Миграцията във възходяща и низходяща посока в растението беше доказана до 21 ден след третиране, където процентът на колонизация в различни тъкани на третираните с почва и третираните с листа тютюневи растения беше доста сходен.

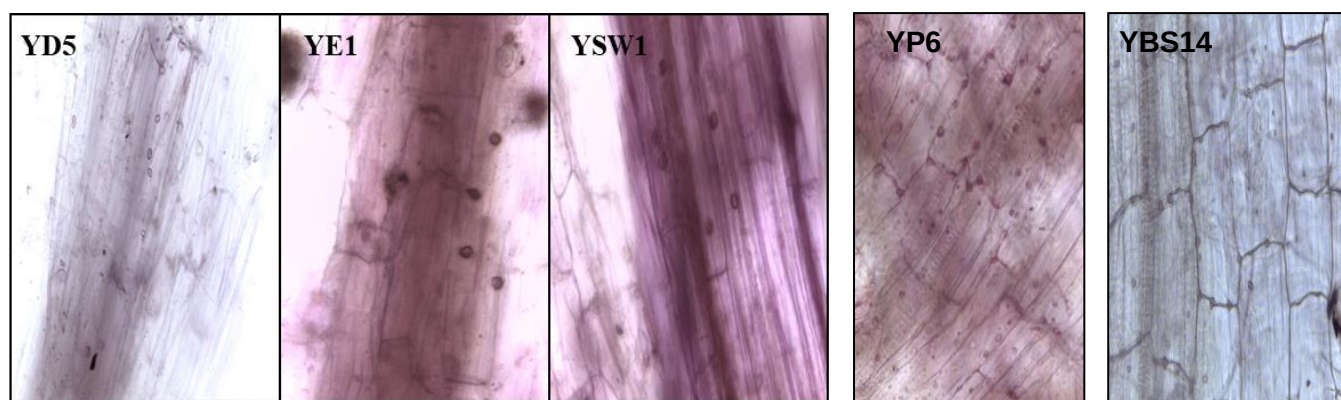


Фигура 9. Ендофитна колонизация на тютюн от изследваните дрожди приложени почвено поливане близо до корена и чрез листно третиране.

4.2. Микроскопско изследване на взаимодействието на изолати на дрожди с корените на тютюна

За определяне на местоположението на дрождите след навлизане в растенията е извършено микроскопско изследване на корените на третираните тютюневи растения. Клетките на дрождите най-често се намират в междуклетъчното пространство на клетките в корена на растенията (фиг. 10). Изключение прави изолат YP6, който е открит в цитоплазмата на

клетките. Един от възможните механизми, отговорни за проникването на дрождите в растителните клетки, може да бъде ендоцитозата (Aniento & Robinson, 2005). Ендоцитозата е процес, при който клетката поглъща частици с различни размери от околната среда. Извършва се чрез сгъване на клетъчната мембрана, което произвежда малка вакуола от страната на цитоплазмата, носеща абсорбирания продукт. Не могат да бъдат изключени системни грешки при приготвянето на микроскопични препарати: дрождевите клетки, обитаващи междуклетъчното пространство, могат да проникнат в растителните клетки, ако целостта на клетката е нарушена. Някои автори обаче допускат и вътреклетъчното развитие на ендوفитни микроорганизми (Nassar et al., 2005). Необходими са по-нататъшни проучвания, за да се разгледа механизмът на проникване на дрождевите клетки в растителните тъкани.

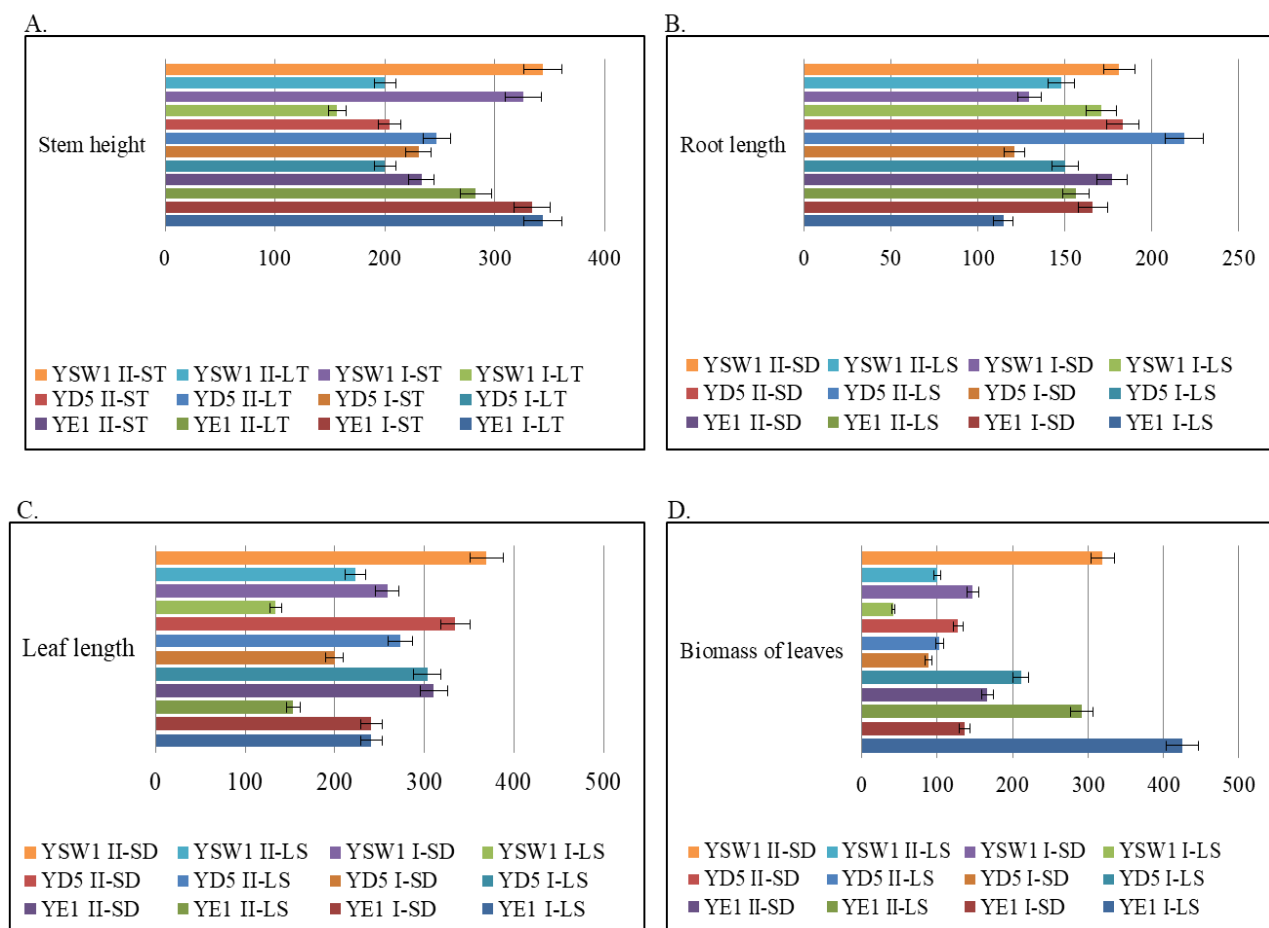


Фигура 10. Взаимодействието на изолати от дрожди с корените на *N. tabacum* е изследвано след третиране и оцветяване на корените по метода на Исаева с увеличение (4 х, 10 х, 20 х и 40 х) на светлинен микроскоп Leika M320.

4.2. Проследяване на влиянието на ендوفитните дрожди върху растежните параметри на тютюневите растения

Резултатите показват, че най-голям растеж на стъблото се наблюдава при третиране с почва растения със *S. kudriavzevii* YSW1. На 7 ден след третиране са отчетени близки стойности при почвено и листно третиране на растежа на надземната част на растенията (фиг. 11). За разлика от тези данни, на 14-ия до 28-ия ден растенията с листно приложени *S. cerevisiae* YD5, *S. kudriavzevii* YSW1 и *Z. bailii* YE1 имат почти два пъти по-високо стъбло и произвеждат по-голяма биомаса. От докладваните данни за растеж на стъблото, измерен на 28 дни, се забелязва, че третираните с почва растения с YSW1 имат по-добри стойности от листно третираните растения с YSW1. Основното увеличение на стъблото е открито при листно пръскане с YE1, последвано от листно пръскане с YD5.

Наблюдавано е, че растенията, третиране с YSW1, показват по-добри стойности при третиране на почвата, а растенията, третиране с YD5 и особено YE1, имат по-добър ефект при листно третиране и имат по-високи стойности от контролните растения (Фиг. 11). След първото третиране са наблюдавани най-високи стойности при листно пръскани растения с YE1 и YD5. След второто третиране с напояване на почвата растенията с YSW1 и листно пръскани с YD5 и YSW1 показват по-високи темпове на растеж на надземната част в сравнение с еднократно третиране. Във всички други експериментални варианти стойностите на растежа на надземните части, отчетени след втората инокулация, са по-ниски в сравнение с еднократното третиране.



Фигура 11. Влияние на биоконтролните дрожди върху параметрите на растежа на тютюневите растения (процент спрямо контролните растения). Тютюневите растения бяха третирани чрез напояване на почвата (SD) и листно пръскане (LS) и бяха направени измервания при четиринадесета дни след третиране (първо третиране) и двадесет и осем дни след третиране (втора обработка).

- A. височина на стъблото,
 B. дължина на корена,
 C. дължина на листа
 D. биомаса на листата.

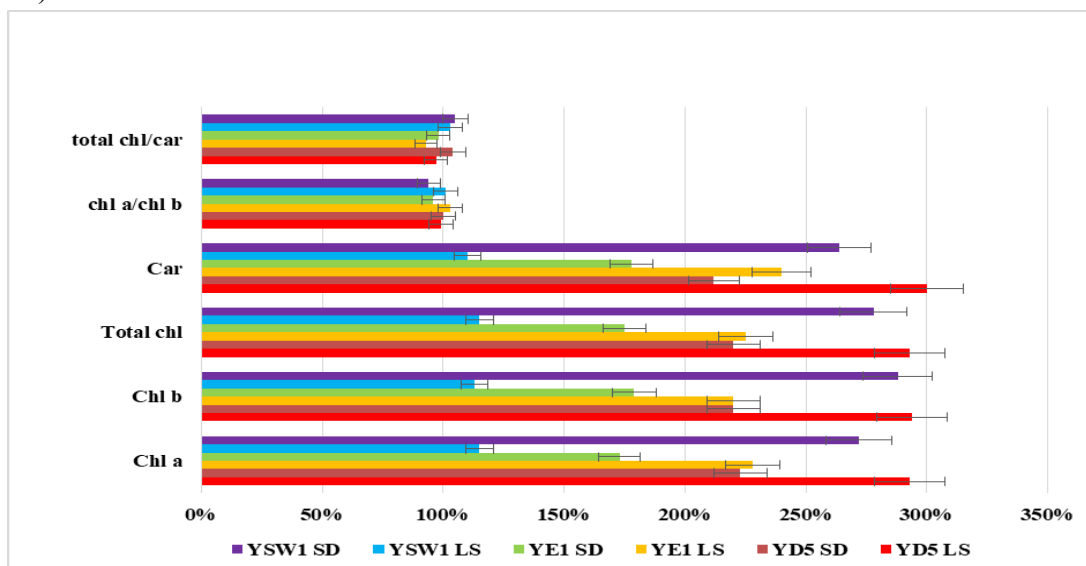
4.3. Ефекти на ендофитните дрожди върху физиологичните параметри на тютюневите растения

Много автори показват, че значителните промени в съдържанието на фотосинтетичните пигменти служат като адаптивна стратегия към различен тип екзогенен или ендегенен стрес (Joshi and Swami 2009; Wagh et al. 2006), така че ние имаме за цел да оценим въздействието на колонизацията на ендофитни дрожди върху физиологията и развитието на растенията. Нашите данни разкриха, че всички прилагани щамове дрожди при всички видове лечения значително повишават концентрацията на фотосинтетичните пигменти в тютюневите листа (фигура 12 A и B).

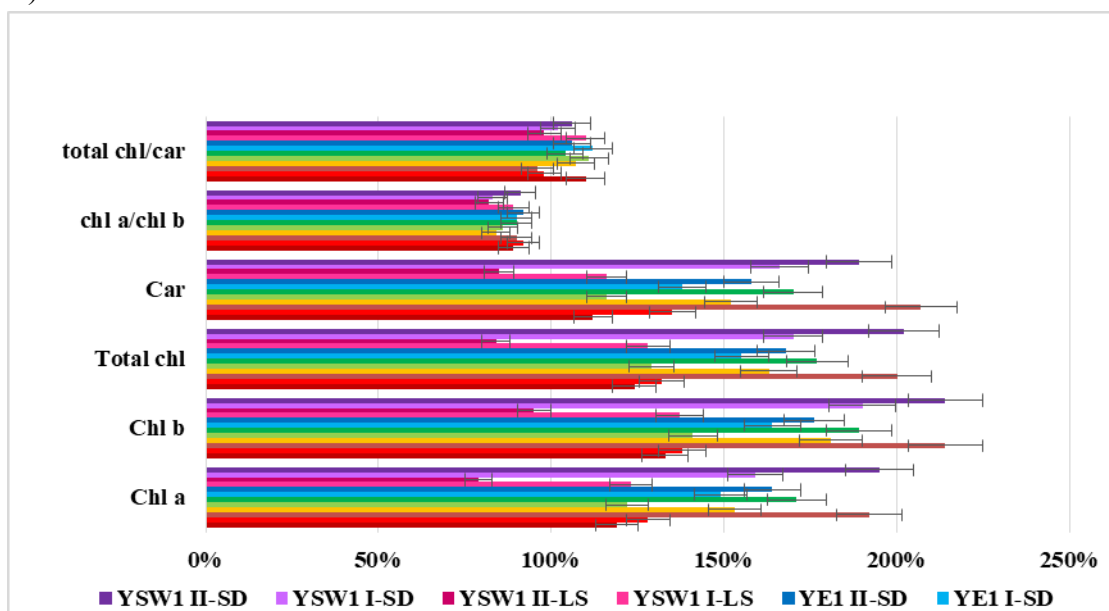
Изключение е установено само за щам YSW1 на *S. kudriavzevii*, където третирането с два листа води до най-ниските стойности както на съдържанието на пигменти, така и на съотношенията на пигменти (79-98% спрямо контролата). Повишеният синтез на хлорофил b е по-изразен при всички експериментални тютюневи растения, следван от тези 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 за развитие и адаптация, което предполага координация на синтеза им в различни физиологични процеси, но най-вече служат като антиоксиданти срещу ендегенен и екзогенен оксидативен стрес, възникващ, когато количеството оксиданти в тялото или клетката надвишава тази на антиоксидантите (Sillanpaa et al. 2008). Независимо от това, съотношението хлорофил a/b и съотношението общ хлорофил/каротеноиди поддържат сходни нива в сравнение с контролните тютюневи растения (съответно 83-92% и 90-106%).

A.)



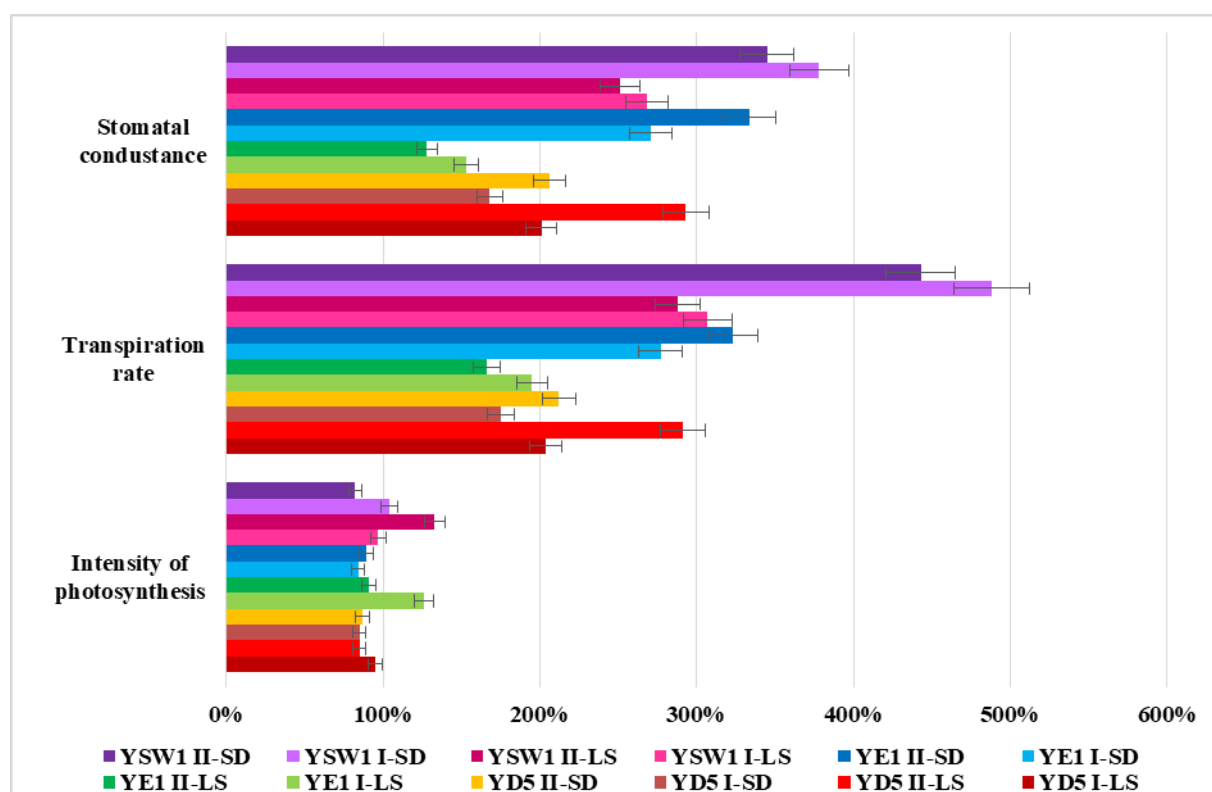
B)



Фиг. 12. А) Анализ за фотосинтетични пигменти в експериментални растения, третирани чрез напояване на почвата (SD) и листно пръскане (LS) 14 дни след първото третиране като процент спрямо контролните растения.

В) Анализ за фотосинтетични пигменти в експериментални растения, третирани чрез напояване на почвата (SD) и листно пръскане (LS) 28 дни след първото третиране като процент спрямо контролните растения.

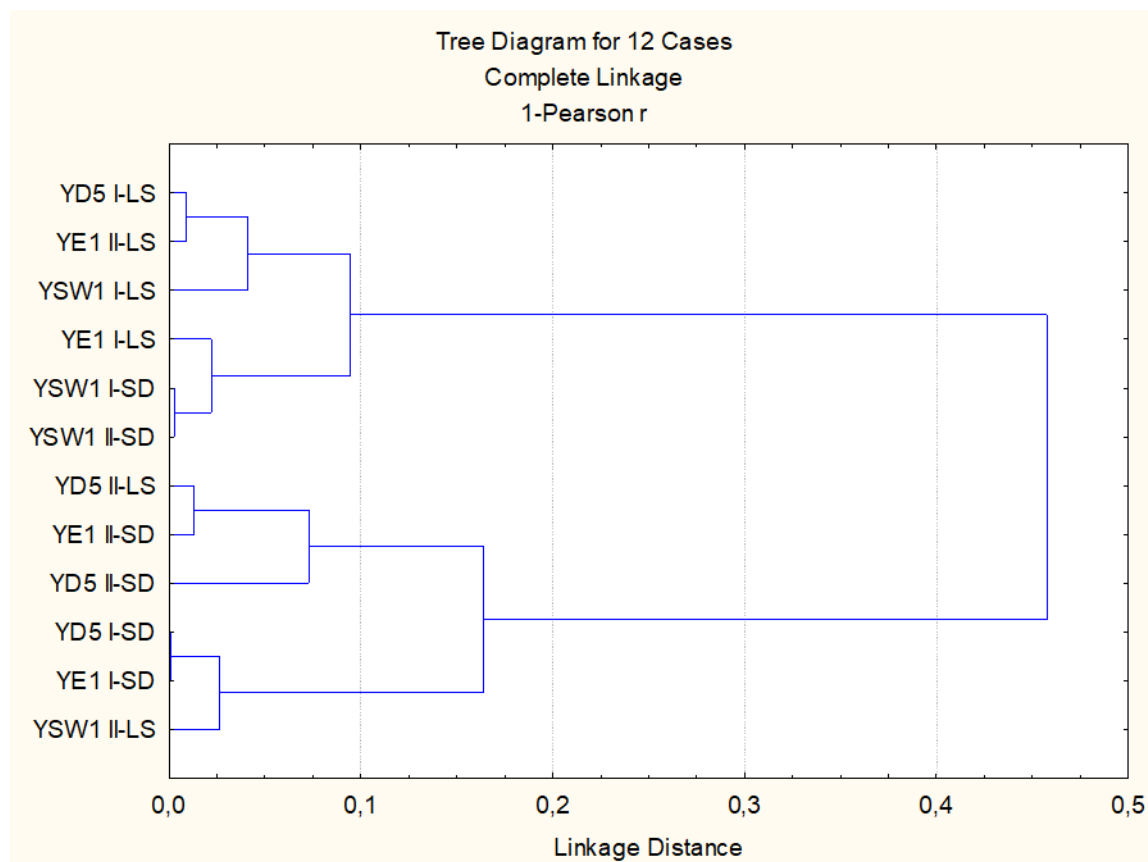
Въз основа на тези констатации може да се заключи, че няма инхибиращо въздействие върху здравето на растенията и физиологията, причинено от колонизацията на ендифитните щамове на дрожди. Освен това те повишават фотосинтетичния потенциал, както и продуктивността на растенията, което е добре демонстрирано и от данни за наблюдение на скоростта на фотосинтеза (Фигури 12 и 13). Периодичните измервания (7-ми, 14-ти, 21-ви, 28-и ден след инокулацията с дрожди) на интензивността на фотосинтезата, транспирацията и устната проводимост на опитните тютюневи растения показват, че взаимното съвместно съществуване на растенията и дрожди не причинява стрес от първия 7 дни след лечението. Получените резултати ще отговарят на констатациите на много автори, че адаптирането на растенията към екстремни стойности на всеки 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 стрес, дължащи се на антиоксидантната защитна система на растителните организми, а третият е свързан със загуба на тегло и смърт на растенията (Levitt, 1972). Най-значимо положително въздействие върху изследваните физиологични характеристики оказва щамът YE1, следван от щамове YSW1 и YD5.



Фигура 13. Интензивност на фотосинтеза и транспирация в опитни тютюневи растения – 28-ми ден след 1-во третиране, 14-ти ден след 2-ро третиране (процент спрямо контролните растения).

Що се отнася до ефекта от пръскането на листата спрямо напояването на корените и ефекта от еднократното третиране спрямо повторното третиране, статистическата оценка на всички изследвани биометрични и физиологични параметри подчертава, че за щам YE1 най-ефективното е двукратно листно инокулиране, докато за YD5 е единична почва и третиране с един лист, а за щам YSW1 е двукратно третиране на почвата ($p < 0,05$). Клъстерният анализ, базиран на изследвани параметри, потвърди, че експерименталните варианти с дублиране на листно пръскане на щамове YSW1 и YD5 не са подобни на инокулираните с листа тютюневи растения (Фигура 14). Образуван са две основни групи, като първата комбинира трите

щамата, приложени чрез листно пръскане и два почвено третирани варианта YSW1, където се наблюдава по-висок стимулиращ ефект. Втората група се състои от напоени с останала почва щамове дрожди и двукратно листно пръскани щамове YD5 и YSW1, където усилването е по-слабо изразено ($p < 0,05$).



Фигура 14. Клъстерен анализ на базата на всички изследвани биометрични и физиологични параметри

Заклучения

Широко известно е, че съдържанието на хлорофил в листата е важен параметър за тестване на състоянието на растенията: може да се използва като индекс за фотосинтетичния потенциал, както и за продуктивността на растенията. Фотосинтетичният процес е един от първите, които се нарушават при възникване на стрес в растителните тъкани. Данните от периодичните наблюдения върху съдържанието на фотосинтетичните пигменти и техните съотношения, както и върху интензитета на фотосинтезата, транспирацията и устната проводимост, ясно показват, че три проучени ендифитни щам дрожди могат да се използват като стимулиращи растежа биоагенти в тютюневи насаждения. Освен това тяхната положителна функция не се ограничава само до развитието на растенията, но те проявяват силна противогъбична активност. Болестите по растенията, причинени от гъбни фитопатогени, са отговорни за големите загуби на реколтата в световен мащаб. Дрождите показват висок потенциал за използване като алтернативна стратегия за управление на гъбни заболявания при тютюна. Изследваните щамове проявяват важни за стимулиране развитието на растенията активности, като разтваряне на неорганични фосфати, изява на протеолитична и способност за синтеза на сидерофори. Продуцирането на литични ензими от почвените микроорганизми се свързва с подобряване на характеристиките на почвата и превръщането на почвените компоненти в усвояема за растенията форма. Синтезата на сидерофори се свързва с атагонистичната активност на изследваните микроорганизми срещу различни

групи фотопатогени, което ги прави потенциални компоненти за препарати свързани с биоконтрола при растенията.

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 изследваните дрожди 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.
- Доказана е способността на изследваните щамове да повишават мобилността на фосфора, синтезират индол-3-оцетна киселина и сидерофори.
- Установена е антимикробната активност на щамове дрожди срещу бактериални и гъбни фитопатогени. При щам YP6 и YE1, антимикробната активност се дължи на отделянето на микоцини.
- Фотосинтезата почти при всички експериментални варианти се отчита по-висока скорост 21 дни след третирането със съответните дрождиеви инокуланти. При измерване на проводимостта на устицата и интензивността на транспирацията се установяват по-високи стойности при почти всички изследвани варианти спрямо контролните растения.

Използвана литература

Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S (2009) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Lett Appl Microbiol* 48: 542–547.

Bajaj, B.K., Raina, S. and Singh, S. 2013. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J. Basic Microbiol.* 53: 645–656.

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.

Cappucino, J.C. and Sherman, N. 1992 In: *Microbiology: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Benjamin / Cumming Pub. Co.

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, et al. (2001) Auxin transport promotes

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

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

Ditengou FA, Teale WD, Kochersperger P, Flittner KA, Kneuper I, van der Graaff E, Nziengui H, Pinosa F, Li X, Nitschke R, Laux T, Palme K. Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 2;105(48):18818-23. doi: 10.1073/pnas.0807814105.

Doty, S. L. (2013). Endophytic yeasts: biology and applications. In *Symbiotic endophytes* (pp. 335-343). Springer, Berlin, Heidelberg.

Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response
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.

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.

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

Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192–195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>

Grzegorzczuk, M., Żarowska, B., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology*, 61, 93-101.

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.

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.

Janisiewicz, W. J., & 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](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158)

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387–405.

Jeyanthi, V., & Ganesh, P. (2013). Production, optimization and characterization of phytohormone indole acetic acid by *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 4(3), 514-520.

Jijakli, M. H., and Lepoivre, P. 1998. Characterization of an exo- β -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](https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.335)

Kizheva, Y., Vancheva, T., Hristova, P., Stoyanova, M., Bogatzevska, N., & Moncheva, P. (2011). Diversity of *Xanthomonas* spp. causal agents of bacterial spot on pepper and tomato plants in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(sup1), 98-104.

Kurtzman, C. P., & 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(4), 331-371.

Kyeon, M. S., Son, S. H., Noh, Y. H., Kim, Y. E., Lee, H. I., & Cha, J. S. (2016). *Xanthomonas euvesicatoria* causes bacterial spot disease on pepper plant in Korea. *The plant pathology journal*, 32(5), 431.

Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, Hove CA, Hogeweg P, et al. (2008) Root system

- Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S, Liu Y. 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal disease of fruit. *Int J Food Microbiol* **167**:153–160.
- MacKay, V. L., Armstrong, J., Yip, C., Welch, S., Walker, K., Osborn, S., & Forstrom, J. (1991). Characterization of the Bar proteinase, an extracellular enzyme from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Structure and function of the aspartic proteinases* (pp. 161-172). Springer, Boston, MA.
- Mano Y, Nemoto K (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot* 63: 2853–2872.
- Manulis S, Shafrir H, Epstein E, Lichter A, Barash I. 1994. Biosynthesis of indole-3-acetic-acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140:1045–1050. <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-140-5>
- 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
- 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.
- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42: 207–220.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 207-220.
- 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. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). Springer, New York, NY.
- 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., Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370 (1948).
- Rao RP, Hunter A, Kashpur O, Normanly J. Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics*. 2010
- Raut, V., Shaikh, I., Naphade, B. Plant growth promotion using microbial IAA producers in conjunction with azolla: a novel approach. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **4**, 1 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0083-3>
- Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse CW. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol* 2008; 9:339- 55; PMID: 18705875; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00470.x>
- Rima, H., Steve, L., & Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3, 421.

- Robiglio A, Sosa MC, Lutz MC, Lopes CA, Sangorrin MP (2011). Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *Int J Food Microbiol* 147: 211–216.
- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J. J., Bermúdez, M. E., & Asensio, M. A. (1998). Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 905-912.
- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Cabello, M. N., Stenglein, S. A. & Scorsetti, A. C. 2015. Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Sci. Technol*, 25(4): 475–480. doi: 10.1080/09583157.2014.982511
- 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.
- 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*). *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 39: 1792–1795.
- Shlyk, A. A. (1971). Biosynthesis of chlorophyll b. *Annual review of plant physiology*, 22(1), 169-184.
- 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.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:425-48; PMID: 17509086; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x> 5
- Spaepen S, Vanderleyden J. Auxin and plant – microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: a001438; PMID: 21084388; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001438> 4
- Spaepen, S. 2015. Plant hormones produced by microbes. In *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 247-256). Springer, Cham.
- Statsoft. Inc (2004) STATISTICA (data analysis software system) Version 7.0. www.statsoft.com
- Teale W. D, Paponov I. A, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:847-59; PMID: 16990790; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2020> 6
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Physiologists Aux/IAA Proteins Repress *uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 39: 1792–1795.
- Van Vuuren, H. J. J., & Jacobs, C. J. (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(2), 119-128.

Walker, G. M., Mcleod, A. H., & Hodgson, V. J. (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS microbiology letters*, 127(3), 213-222.

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.

Публикувани резултати за 2021

Mariana Petkova , Velichka Spasova-Apostolova, Veselina Masheva, Daniela Atanasova and Nurettin Tahsin. Endophytic colonization of *Solanaceae* family plants by fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* strain 339 to control Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Bulgarian Journal of Agricultural Science , 2021, 27 (Suppl. 1), p. 143-149. Реферирано в Scopus

Цитирания: 1 брой

Scheepmaker, J.W. (2021). Exploring the necessity of additional data requirements under the pesticide regulation to take into account endophytes.

Mariana Petkova, Slaveya Petrova, Velichka Spasova-Apostolova, and Mladen Naydenov. TOBACCO PLANT GROWTH-PROMOTING AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF THREE ENDOPHYTIC YEAST STRAINS. Journal Industrial Crops and Products. Submitted. Реферирано в Scopus

Участие в конференции през 2021 година

32-ра годишна среща по AAIC (5-8 Септември), Болония, Италия с доклад на тема: „*SOLANACEAE* PLANTS GROWTH-PROMOTING BY TWO ENDOPHYTIC YEAST STRAINS AND THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITIES “

2-ра Научна конференция на Аграрен университет Пловдив участие с доклад по проект 01-20 на тема „Изолиране и характеризиране на ендофитни микроорганизми и перспективи за приложението им в биологичното земеделие“.