

СОКОЛОВА Н., ЄМЕЦЬ А.✉

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького 2а, ORCID: 0000-0001-6887-0705

✉ yemets.alla@nas.gov.ua

ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЛЮВАННЯ ДРІЖДЖІВ ІЗ КОРЕНЕВОГО МІКРОБІОМУ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Мета. Розробка підходів ізолювання дріжджів-симбіонтів з ризосфери різних сортів пшениці озимої для їх подальшого таксономічного визначення, а також вивчення впливу певних видів дріжджів на ріст і розвиток рослин пшениці. **Методи.** Ізолювання та ідентифікацію дріжджів з кореневого мікробіому обраних сортів пшениці проводили, використовуючи мікробіологічні та мікроскопічні методи досліджень. **Результати.** Підбрано умови, проведено ізолювання та первинну ідентифікацію дріжджів з кореневого мікробіому сортів пшениці озимої у різні періоди вирощування. Виявлено наступні види дріжджів: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Papiliotrema terrestris*, *Pichia fermentans*, *Candida subhashii*, *Torulaspora delbruecki* та *Candida* sp. **Висновки.** Відмічено різницю у видовому складі дріжджів-симбіонтів у різний період розвитку озимої пшениці сортів Лісова Пісня, Переяслівка, Богдана, Смуглянка, Подолянка, Колонія, Реформ і Ребелл. Отримані дані підкреслюють важливість вивчення ризосферного мікробіому, зокрема функціональної ролі дріжджів, для розуміння механізмів взаємодії між рослиною та ґрунтом, а також для розвитку ефективних агрономічних стратегій у вирощуванні пшениці та інших культур.

Ключові слова: пшениця, корінь, мікробіом, дріжджі.

Дослідження мікробіомів рослин та ґрунту стає все більш актуальним у контексті розуміння впливу мікроорганізмів на підвищення продуктивності сільськогосподарських рослин. Особливу увагу заслуговує аналіз ризосферного мікробіому, який утворює активну зону у ґрунті, де відбувається взаємодія між кореневою системою рослин та ґрунтовими мікроорганізмами, що регулюють обмін поживними речовинами між рослинами та ґрунтом. Мікроорганізми ризосфери мають вирішальне значення для біохімічних процесів ґрунту, оскільки вони активно беруть участь у перетворенні фосфору та

азоту, ключових елементів для життєдіяльності рослин. Основні функції цих мікроорганізмів полягають у фіксації азоту діазотрофними бактеріями та розчиненні фосфату бактеріями, грибами та дріжджами, що сприяє покращенню здоров'я та росту рослин [1].

Дріжджі, як представники еукаріотичних одноклітинних мікроорганізмів [2, 3], широко поширені у природних середовищах і відіграють важливу роль у ґрунтовій екосистемі завдяки своїй значній біологічній активності, зокрема у відповіді на дію стресових факторів [3]. Вони є частиною складної екосистемної взаємодії, що забезпечує нормальний розвиток і функціонування рослин. Дріжджі залучені до багатьох процесів, таких, наприклад, як розчинення фосфатів, впливають на безліч фізіологічних процесів, зокрема, на синтез індолацетової кислоти (ІОК), підвищують засвоєння поживних речовин, а також викликають конкуренцію з деякими патогенними мікроорганізмами, що важливо для підтримки родючості ґрунту та росту рослин [3-8]. Зазначені функції, притаманні дріжджам, які стимулюють ріст рослин (Plant Growth-Promoting Yeasts, PGPY), відіграють важливу роль у фітомікробній взаємодії та підвищенні продуктивності рослин [3-5]. Найбільш поширеними серед PGPY є представники *Candida* spp. (15 %), *Rhodotorula* spp. (14 %), *Cryptococcus* spp. (13 %) та *Saccharomyces* sp. (9 %) [3].

Однією з найвразливіших культур до різних стресових чинників, зокрема посухи, засолення та високих температур, є пшениця (*Triticum aestivum* L.) [9, 10]. Стале вирощування та висока врожайність пшениці є запорукою харчової та економічної безпеки багатьох країн світу. Її успішний ріст і розвиток залежать від багатьох факторів, серед яких склад мікробіому ризосфери, який, як зазначено вище, є ключовим компонентом ґрунтової екосистеми та відіграє важливу роль у забезпеченні рослин життєво важливими поживними речовинами. Вивчен-

© СОКОЛОВА Н., ЄМЕЦЬ А.

ня ризосферного мікробіому, зокрема дріжджів, та їх впливу на розвиток коренів та рослини в цілому, є важливим також для розуміння механізмів, які лежать в основі взаємодії рослин з ґрунтом. Дослідження показують, що дріжджі сприяють збільшенню кореневої системи, що в свою чергу підвищує засвоєння води та поживних речовин рослиною. За стресових умов мікробіом ризосфери може допомагати рослинам виживати та функціонувати, забезпечуючи доступ до додаткових ресурсів та захищати від негативного впливу стресових факторів [11–13].

Отже, дослідження складу мікробіому ризосфери пшениці, зокрема ідентифікація і вивчення ріст-стимулюючої ролі дріжджів, є важливим для покращення її вирощування на різних типах ґрунтів, а також за дії абіотичних стресових чинників. Тому, метою дослідження було розробити підходи щодо ізолювання дріжджів-симбіонтів з ризосфери різних сортів пшениці озимої для їх подальшого таксономічного визначення, вивчення впливу певних видів дріжджів на ріст і розвиток рослин пшениці як за нормальних умов, так і за умов змодельованої посухи та дії високих температур.

Матеріали і методи

У роботі досліджували наступні вітчизняні та іноземні сорти озимої пшениці: Лісова Пісня, Переяслівка, Богдана, Смуглянка, Подольянка, Колонія, Реформ і Ребелл, які вирощували на експериментальній ділянці м. Києва та дослідних полях Київської області. Відбір зразків мікробіому ризосфери проводили у листопаді 2022 р., а також у квітні 2023 р. у період куціння пшениці.

Ізолювання штамів дріжджів проводили наступним чином: спочатку корені пшениці досліджуваних сортів відокремлювали та механічно ретельно очищали від ґрунту так, щоб не пошкодити кореневу систему. Після цього корені (довжиною 3–5 см) переносили для культивування в 50 мл рідкого стерильного живильного середовища YPD, що містило 1 % дріжджового екстракту, 2 % пептону, 2 % глюкози, рН 5.5, доповнене антибіотиками: хлорамфенікол/левоміцетин (500 мг/л) та ампіцилін (100 мг/л) для пригнічення росту бактерій та грибів, які входили до складу ризосферного мікробіому. Корені культивували протягом 1–2 діб за температури 26–28°C на орбітальному шейкері (180–200 об/хв). Потім 50 мкл суспензійної культури, утвореної у результаті культивування,

висівали у чашки Петрі на агаризоване середовище YPD із зазначеними вище антибіотиками та культивували у темряві протягом 7 діб за температури 26–28°C. Отримані колонії дріжджів відбирали та культивували на цьому середовищі за аналогічних умов для подальшого їх аналізу та ідентифікації за допомогою, зокрема, світлової мікроскопії.

Результати та обговорення

У роботі проводили відбір зразків мікробіому ризосфери пшениці досліджуваних сортів вітчизняної та зарубіжної селекції у листопаді та у квітні у період осіннього та весняного куціння, оскільки під час куціння активно розвивається коренева система, яка забезпечує рослини водою та поживними речовинами, що позитивно впливає на ріст, розвиток і продуктивність пшениці [11, 12]. Отже, періоди куціння є критичними для успішного вирощування пшениці озимої, оскільки впливають на формування кореневої системи, активізацію фізіологічних процесів та загальний розвиток рослин. Під час куціння пшениці активізуються фізіологічні процеси, які підвищуються її витривалість до негативних факторів навколишнього середовища [12]. Дослідження саме цих етапів періоду розвитку рослин може допомогти покращити способи вирощування пшениці озимої та забезпечити її стабільний врожай.

При проведенні досліджень нами було обрано ряд сортів озимої пшениці, які мають різні характеристики та властивості. Так, сорт Подольянка відрізняється високою середньою врожайністю, характеризується середньою адаптованістю до різних кліматичних умов, а також виявляє стійкість до хвороб та шкідників. Зерно цього сорту має високу якість [13], що сприятливо впливає на виробництво хліба та інших харчових продуктів. Сорт Смуглянка проявляє високу стійкість до низьких температур; має вищу середню врожайність навіть при вирощуванні у важких кліматичних умовах, а також відзначається адаптованістю до різних типів ґрунтів. Зерно цього сорту має підвищений вміст білка, що важливо для покращення якості хліба. Сорт Переяслівка проявляє високу середню врожайність та стабільний врожайний потенціал, характеризується стійкістю до стресових умов, таких як посуха, а також високою якістю зерна. Крім того, цей сорт демонструє адаптованість до різних методів вирощування, що робить його популярним серед аграріїв. Сорт Бог-

дана відрізняється високою врожайністю, проявляє стійкість до стресових умов, має вищий вміст білка в зерні та відзначається адаптованістю до різних типів ґрунтів. Сорт Ребел характеризується високою середньою врожайністю, проявляє сприятливі показники під час стресових умов, а також має високу якість зерна. Сорти Колонія та Реформ мають подібні характеристики, зокрема такі, як добра адаптованість до різних умов вирощування та стабільний врожайний потенціал. Однак, сорт Колонія виявляє помірну стійкість до хвороб і шкідників, тоді як Реформ відзначається високою стійкістю до стресових умов, таких як посушливість і низькі температури [14, 15].

Ізолювання та ідентифікацію дріжджів з мікробіому коренів зазначених сортів пшениці проводили, враховуючи особливості агрохімічного складу ґрунту дослідних полів Київської області, де було відібрано зразки для наших досліджень. За наданою інформацією (результати аналізу ґрунту) ґрунт, де вирощували досліджувані сорти пшениці, за кислотністю є слабкокислим, з рівнем рН 5,1. Вміст азоту, визначений за методом Корнфілда, складав 198,8 мг/кг ґрунту. Рухомий фосфор, визначений за методом Чирікова, становив 112,0 мг/кг, тоді як обмінний калій – 80,0 мг/кг. Вміст гумусу, оцінений за методом Тюріна, становив 3,09 %. Сума ввібраних основ складала 22,6 ммоль/100 г ґрунту, включаючи обмінний кальцій (19,6 мг-екв/100 г) та обмінний магній (2,0 мг-екв/100 г). Вміст сірки становив 8,5 мг/кг, марганцю – 4,94 мг/кг, міді – 0,161 мг/кг та цинку – 0,351 мг/кг. Щодо вмісту солей важких металів, виявлено, що вміст кадмію становив 0,062 мг/кг, а свинцю – 0,580 мг/кг.

У результаті проведених досліджень нами було успішно проведено ізолювання та виявлено різні види дріжджів у мікробіомі коренів всіх проаналізованих сортів пшениці. Так, у зразках, отриманих під час осіннього сезону кушення сортів Лісова Пісня та Переяслівка, ізолювано та виявлено дріжджі, що належать до виду

Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C.Hansen, у зразках, отриманих з сортів Ребелл, Колонія та Реформ ізолювано та виявлено дріжджі виду *Hanseniaspora uvarum* (Niehaus) Shehata, Mraak & Phaff ex M.T. Sm. У зразках, отриманих з сорту Богдана, виявлено вид *Papiliotrema terrestris* та представників роду *Candida*.

При аналізі складу ризосферного мікробіому у досліджуваних сортів пшениці у період їх весняного кушення було ідентифіковано наступні види дріжджів: *Pichia fermentans* у сортів Подолянка та Богдана, *Candida subhashii* у сорту Смуглянка, *Torulasporea delbrueckii* у сорту Переяслівка. У той же час, як у кореневому мікробіомі сортів Лісова Пісня, Реформ та Колонія не спостерігали ніяких змін, в зразках були виявлені ті ж самі види дріжджів, що і при осінньому кушенні рослин цих сортів. Слід зазначити, що склад ґрунту також вносить свій суттєвий вклад у склад ризосферного мікробіому рослин і пшениці, зокрема.

Висновки

За результатами проведених досліджень спостерігали певну відмінність у видовому складі дріжджів-симбіонтів у проаналізованих зразках, отриманих у різний період розвитку (осінній та весняний періоди кушення) озимої пшениці сортів Лісова Пісня, Переяслівка, Богдана, Смуглянка, Подолянка, Колонія, Реформ і Ребелл. Отримані дані підкреслюють важливість вивчення ризосферного мікробіому, зокрема функціональної ролі дріжджів, для розуміння механізмів взаємодії між рослиною та ґрунтом, а також для розвитку ефективних агрономічних стратегій у вирощуванні пшениці та інших культур.

Інформація про фінансову підтримку, подяки. Роботу виконано та за фінансової підтримки НАН України (бюджетна програма КПКВК 6541030, 2024-2028 рр., Державний реєстраційний номер: 0124U002424). Автори висловлюють подяку д. б. н. Дмитруку К.В. за методичні поради в ізолюванні та ідентифікації дріжджів та Соцінову І.О. за сприяння у відборі рослинного матеріалу та надання інформації про складу ґрунту при виконанні дослідження.

References

1. Sarabia, M., Cazares S., González-Rodríguez A., Mora F., Carreón-Abud Y., Larsen J. Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. *Rhizosphere*. 2018. Vol. 6. P. 67–73. doi: 10.1016/j.rhisph.2018.04.002.
2. Thapa S., Shrestha R., Tirewal A., Sharma A., Y. K.C. Isolation of yeast from soil and different food samples and its characterization based on fermentation. *Nepal J. Biotechnol.* 2015. Vol. 3 (1). P. 29–34. doi: 10.3126/njb.v3i1.14226.
3. Nimsi K.A., Manjusha K., Kathiresan K., Arya H. Plant growth-promoting yeasts (PGPY). *J. Appl. Microbiol.* 2022. Vol. 134 (2). P. 1–11. doi:10.1093/jambio/txac088.

4. Zaky A. S., Greetham D., Louis E. J., Tucker G. A., Du C. A new isolation and evaluation method for marine-derived yeast spp. with potential applications in industrial biotechnology. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 26(11). P. 1891–1907. doi: 10.4014/jmb.1605.05074.
5. Fu, S. F., Sun, P. F., Lu, H. Y., Wei, J. Y., Xiao, H. S., Fang, W. T., Chou, J. Y. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biol.* 2016. Vol. 120 (3). P. 433–448. doi: 10.1016/j.funbio.2015.12.006.
6. Yurkov A. M. Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast.* 2018. Vol. 35 (5). P. 369–378. doi: 10.1002/yea.3310.
7. McPherson M. R., Wang P., Marsh E. L., Mitchell R. B., Schachtman D. P. Isolation and analysis of microbial communities in soil, rhizosphere, and roots in perennial grass experiments. *J. Vis. Exp.* 2018. Vol. 137. 5793. doi: 10.3791/57932.
8. Fernandez-San Millan A., Farran L., Larraya L., Ancin M., Arregui L. M., Veramendi J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: Benefits for seedling development. *Microbiol. Res.* 2020. Vol. 237. 126480. doi: 10.1016/j.micres.2020.126480.
9. Hoshikawa K. Studies on the ripening of wheat grain: 4. Influence of temperature upon the development of the endosperm. *Japan. J. Crop Sci.* Vol. 30 (3). P. 228–231. doi: 10.1626/jcs.30.228.
10. Prasad P. V., Pisipati S. R., Risti, Z., Bukovnik U. R. S. K. A., Fritz, A. K. Impact of nighttime temperature on physiology and growth of spring wheat. *Crop Sci.* 2008. Vol. 48 (6). P. 1911–1917. doi: 10.1016/j.jplph.2009.11.007.
11. Shang Q., Wang Y., Tang H., Sui N., Zhang X., Wang, F. Genetic, hormonal, and environmental control of tillering in wheat. *Crop J.* 2021. Vol. 9 (5). P. 986–991. doi: 10.1016/j.cj.2021.03.002.
12. Tilley M. S., Heiniger R. W., Crozier C. R. Tiller Initiation and its Effects on Yield and Yield Components in Winter Wheat. *Agronomy J.* 2019. Vol. 111 (3). P. 1323–1332. doi: 10.2134/agronj2018.07.0469.
13. Nazarenko M., Mykolenko S., Okhmat P. Variation in grain productivity and quality of modern winter wheat varieties in northern Ukrainian Steppe. *Ukrainian Journal of Ecology.* 2020. Vol. 10 (4). P. 102–108. doi:10.15421/2020_175.
14. Morgun V. V., Topchiiy T. V. The importance of resistant varieties of winter wheat, study of sources and donors of resistance to pests and major pathogens. *Plant Physiology and Genetics.* 2018. Vol. 50 (3). P. 218–240.
15. Gospodarenko G. M., Lyubych V. V., Ryabovol Y. S., Kokhovska I. V. Yield and grain quality of winter soft wheat depending on the variety. *Scientific works of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet.* 2021. Vol. 29. P. 144–151. doi: 10.47414/np.29.2021.244457.

SOKOLOVA N., YEMETS A.

Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2a

FEATURES OF THE ISOLATION OF YEAST FROM THE ROOT MICROBIOME OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Aim. Development of approaches for isolating yeast symbionts from the rhizosphere of various varieties of winter wheat for their further taxonomic identification, as well as studying the influence of yeast species on the growth and development of wheat plants. **Methods.** Isolation and identification of yeast from the root microbiome of selected wheat varieties was carried out using microbiological and microscopic research methods. **Results.** As a result of the investigation, conditions were selected, isolation and primary identification of yeast from the root microbiome of winter wheat varieties in different growing periods was carried out. The following yeast species were identified: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Papiliotrema terrestris*, *Pichia fermentans*, *Candida subhashii*, *Torulaspora delbrueckii* and *Candida* sp. **Conclusions.** The difference in the species composition of yeast-symbionts in different periods of development of winter wheat varieties Lisova Pisnya, Pereyaslivka, Bohdana, Smuglyanka, Podolyanka, Kolonia, Reform and Rebel was noted. The obtained data emphasize the importance of studying the rhizosphere microbiome, in particular the functional role of yeast, for understanding the mechanisms of interaction between the plant and the soil, as well as for the development of effective agronomic strategies in the cultivation of wheat and other crops.

Keywords: wheat, root, microbiome, yeast.