

УДК 581.1:582.23:57.04

О.І. Віннікова*, А.Т. Дрофа, І.М. Раєвська

Вплив бактеризації *Anabaena flos-aquae* і *Pseudomonas putida* та обробки саліциловою кислотою на холодостійкість бобових рослин

UDC 581.1:582.23:57.04

O.I. Vinnikova*, A.T. Drofa, I.M. Raievska

Impact of Bacterization with *Anabaena flos-aquae* and *Pseudomonas putida* and Salicylic Acid Treatment on Cold Resistance in Leguminous Plants

Реферат: У роботі представлено результати дослідження впливу холодової експозиції (4°C) на морфометричні показники рослин, проникність клітинних мембран листків, активність поліфенолоксидази і стан актинових фібрил у клітинах коренів гороху (*Pisum sativum*) та квасолі (*Phaseolus vulgaris*) за умов попередньої обробки насіння саліциловою кислотою (СК) чи його бактеризації чистими культурами *Anabaena flos-aquae* і *Pseudomonas putida* або їх сумішшю. Ростові реакції різних за холодостійкістю рослин гороху і квасолі на дію холоду в цілому мали різноспрямований характер. За негайної дії холодом одразу після бактеризації визначався позитивний вплив обробки СК на холодостійкість рослин гороху. За відтермінованого холодового стресу (через 7 діб після бактеризації) попередня обробка насіння суспензіями мікроорганізмів чи їх сумішшю сприяла розвиненню холодостійкості квасолі. Бактеризація насіння переважно знижувала проникність клітинних мембран у листках гороху та квасолі, а також позитивно впливала на стан актинових фібрил в клітинах коренів. У цілому деякий протекторний ефект для рослин гороху був встановлений як за умов бактеризації насіння, так і його обробки СК. Для рослин квасолі відчутний протекторний ефект давала бактеризація насіння.

Ключові слова: бактеризація, саліцилова кислота, холодовий стрес, холодостійкість рослин, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*.

Abstract: The paper presents the results of studying the effects of exposure of pea (*Pisum sativum*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds or young sprouts to low temperature (4°C) with preliminary treatment of seeds with salicylic acid (SA), or with pure cultures of *Anabaena flos-aquae* or *Pseudomonas putida*, or with their mixture. Cold exposure lasting 24 hrs was carried out immediately or 7 days after SA treatment or bacterization of seeds. Morphometric parameters of roots and sprouts, permeability of cell membranes in leaves, activity of polyphenol oxidase and state of actin filaments in root cells were measured. Pea and bean plants differ in cold resistance, and their growth responses to low temperature exposure were multidirectional. Treatment with SA immediately before exposure to cold had a positive effect on cold resistance of pea plants. Under the delayed cold stress, seed bacterization with single bacteria suspensions or their mixture contributed to the development of cold resistance in beans. Bacterization of seeds presumably reduced the permeability of cell membranes in leaves of both plant species and improved the state of actin filaments in root cells. In general, some protective effect for peas was observed due to either bacterial or SA treatment of seeds. In bean plants, the meaningful protective effect occurred after seed bacterization only.

Key words: bacterization, salicylic acid, cold stress, cold resistance of plants, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*.

За умов постійного зростання населення світу надважливим є збільшення чисельності харчових продуктів. При цьому виробництво сільгосппродукції відбувається на тлі скорочення сільськогосподарських угідь, ґрунтовтоми, біотичного та абіотичного стресу, що знижує продуктивність рослин [10]. В рослинництві серед абіотичних стресів друге місце після дефіциту елементів живлення посідає холодовий вплив [28]. На сьогодні бобові є не тільки важливою культурою для сівозмін, а й джерелом цінних амінокислот і рослинного білка, що розглядається

Increasing food production is crucial in the context of a steadily growing world population. At the same time, agricultural crops are being produced against the backdrop of shrinking agricultural land, soil fatigue, biotic and abiotic stress, which reduce plant productivity [12]. In crop production, among the abiotic stresses the cold exposure ranks second after nutrient deficiency [28]. Today, the legumes are not only important plants for crop rotation, but also a source of valuable amino acids and vegetable protein considered as an alternative to animal protein [2, 6, 20]. There-

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. майдан Свободи, 4, м. Харків, Україна 61022;
тел.: (+38 057) 707-54-82
електронна пошта: o.i.vinnikova@karazin.ua

*To whom correspondence should be addressed:

4, Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine 61022;
tel.: +380 57 707 5482
e-mail: o.i.vinnikova@karazin.ua

Надійшла 18.04. 2024

Прийнята до друку 27.05.2024

Received April, 18, 2024

Accepted May, 27, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

як альтернатива тваринному [3, 13, 19]. Тому підвищення продуктивності саме бобових культур є важливим завданням для сталого сільського господарства. В умовах істотних змін клімату рослини під час росту витримують вплив різноманітних чинників довкілля. За дії холоду знижується енергія і швидкість проростання насіння, затримується ріст рослин, що може призводити до значних втрат врожаю. Також внаслідок впливу низьких температур рослини стають більш вразливими до фітопатогенів [18]. Холодовий стрес негативно впливає на весь рослинний організм. Прямим і, ймовірно, найранішим наслідком впливу коливань температури на клітини рослин є зміна проникності та плинності (текучості) мембран. Також у механізмі сприйняття холоду у вищих рослин важливу роль відіграють компоненти цитоскелета клітини. Через зміну плинності мембран, що приводить до вивільнення іонів кальцію з вакуолі в цитоплазму клітин, відбувається деполімеризація мікротрубочок і актинових мікрофіламентів [12]. Відомо, що система мікрофіламентів не тільки підтримує форму клітин, їх внутрішню будову, а й забезпечує нормальну фізіологічну функцію та регулює внутрішньоклітинну активність за дії різних стресорів [20, 23].

Рослинні організми виробили певні механізми подолання температурного стресу. Зокрема, у відповідь на гіпотермію відбувається опосередковане як ендогенною, так і екзогенною саліциловою кислотою (СК) накопичення рослинною клітиною осмолітів, посилено синтезуються вторинні метаболіти, відбувається регуляція вмісту рослинних фітогормонів [15]. Саме ці властивості СК сприяли розвитку технології екзогенної обробки насіння чи проростків задля подолання абіотичних стресів та стресостійкості рослин [2].

Завданням сучасних аграрних технологій є створення умов вирощування культур для зниження негативних реакцій рослин на дію стресових факторів. Одним зі шляхів зниження пошкоджуючої дії холоду на рослину є застосування біотехнологій, зокрема, бактеризації — обробки насіння корисною мікрофлорою. В природі рослини піддаються стресам під час взаємодії з мікробними спільнотами, які зазнають змін у своїй активності та складі в мінливому середовищі [26]. Пов'язані з рослинами мікробіоти мають потенціал для подолання абіотичних стресів, що приводить до підвищення врожайності в системах землеробства [10]. На сьогодні в літературі широко представлено позитивний

fore, increasing the legume productivity is a topical task for sustainable agriculture. Under significant climate change, plants can tolerate the impact of various environmental factors during growth. The cold exposure decreases the energy and speed of seed germination, and delays plant growth, which can result in significant yield losses. Also, plants become more vulnerable to phytopathogens due to exposure to low temperatures [19]. Cold stress negatively affects the entire plant organism. A direct and probably the earliest effect of temperature fluctuations on plant cells is a change in membrane permeability and fluidity. In addition, the components of cell cytoskeleton play an important role in cold perception in higher plants. Due to changes in membrane fluidity, resulting in calcium ion release from the vacuole into cell cytoplasm, the microtubules and actin microfilaments are depolymerized [14]. It is known that the microfilament system not only maintains the shape of cells and their internal structure, but also ensures normal physiological function and regulates intracellular activity under exposure to various stressors [21, 24].

Plant organisms have developed certain tolerance mechanisms to temperature stress. In particular, in response to hypothermia, a plant cell accumulates the osmolytes mediated by both endogenous and exogenous salicylic acid (SA), secondary metabolites are intensively synthesized, and the regulation of plant phytohormone content occurs [16]. These very properties of SA promoted the development of technology for seed or seedling exogenous treatment to overcome abiotic stresses and improve stress tolerance in plants [5].

The task of modern agricultural technologies is to create conditions for growing crops to mitigate negative responses of plants to the impact of stress factors. The use of biotechnology, in particular, bacterization, *i. e.* seed treatment with beneficial bacteria is one of the ways to reduce damaging effects of cold on plants. In nature, plants are exposed to stress when interacting with microbial communities, which undergo changes in their activity and composition in dynamic environment [3]. Plant-associated microbiomes have a potential to overcome abiotic stresses, thereby improving yields in farming systems [12]. Today, a positive experience of using representatives of beneficial soil microflora to improve the productivity of various crops is widely reported in the literature. For inoculation, scientists have used both monocultures of bacteria and combined cultures containing several species of



досвід використання представників корисної мікрофлори ґрунту для покращення продуктивності різних сільськогосподарських культур. При цьому для інокуляції науковці використовували як монокультури бактерій, так і комбіновані культури, що містили кілька видів мікроорганізмів [5, 9, 10, 18]. Проте існує дефіцит даних щодо можливостей одночасного використання представників хемо- і фототрофного блоків мікробіому ґрунту. Хоча, наприклад, ціанобактерії можуть застосовуватися в сільському господарстві як органічні добрива, кондиціонери ґрунту, біопестициди та біостимулятори рослин [30]. Є приклади позитивного одночасного використання ціанобактерій (*Nostoc muscorum*, *Anabaena flos-aquae*) та ґрунтових бактерій-діазотрофів [27].

Для покращення розвитку бобових рослин частіше використовують біопрепарати на основі бульбочкових бактерій. У той же час насіння може підлягати холодовому стресу на етапі проростання, коли симбіотичні бактерії ще не вступили в контакт з рослиною. Тому використання корисних ґрунтових хемо- і фототрофних прокаріотів для бактеризації насіння може позитивно вплинути на проростання і розвиток проростків бобових рослин. Варто зазначити, що питання щодо «універсальності» застосування одних і тих самих бактеріальних штамів для підвищення продуктивності різних сільськогосподарських культур залишається відкритим. Вважається, що дві основні бобові культури — кvasоля і горох — відрізняються за холодостійкістю, зокрема горох, який є більш стійким до дії холоду порівняно з кvasолею.

Мета роботи — вивчення впливу бактеризації *Anabaena flos-aquae* і *Pseudomonas putida* та обробки саліциловою кислотою насіння кvasолі і гороху на формування холодостійкості цих рослин.

Матеріали і методи

У дослідженні було використано насіння кvasолі *Phaseolus vulgaris* L. сорту Докучаєвський (виведений в Харківському аграрному університеті ім. В.В. Докучаєва) та гороху *Pisum sativum* L. сорту Астронавт СН1, які зареєстровані в Державному реєстрі сортів рослин України та отримані з випробувальної лабораторії «Агроген Ново» (м. Харків). Також використовували чисті культури ціанобактерії *Anabaena flos-aquae* (Lyngh.) Bred. штаму РРMSU з колекції культур мікроводоростей кафедри ботаніки та екології рослин Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна та *Pseudomonas putida*

microorganisms [7, 11, 12, 20]. However, the data on possible simultaneous use of representatives of chemo- and phototrophic blocks of soil microbiome are scarce. Although, for example, cyanobacteria can be used in agriculture as organic fertilizers, soil conditioners, biopesticides, and plant biostimulants [30]. There are the examples of beneficial simultaneous use of cyanobacteria (*Nostoc muscorum*, *Anabaena flos-aquae*) and soil diazotrophic bacteria [27].

Biological products based on nodule bacteria are often used to improve the legumes development. At the same time, the seeds can be exposed to cold stress at germination stage, when symbiotic bacteria have not yet contacted the plant. Therefore, the use of beneficial soil chemo- and phototrophic prokaryotes for seed bacterization can positively affect the germination and development in legume seedlings. Notably, that the question of ‘versatility’ of using the same bacterial strains to improve the productivity in different crops is still unclear. The two main legumes, beans and peas, are believed to differ in cold tolerance, especially peas, which are more resistant to cold than beans.

The research aim herein was to investigate the impact of bacterization with *Anabaena flos-aquae* and *Pseudomonas putida* and treatment with salicylic acid of bean and pea seeds on cold tolerance formation in these plants.

Materials and methods

Here, we have used the seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) of Dokuchaievskiy cultivar (bred at V.V. Dokuchaiev Kharkiv Agrarian University) and pea (*Pisum sativum* L.) of Astronaut SN1 cultivar, registered in the State Register of Plant Varieties of Ukraine and obtained from the testing laboratory ‘Agrogen Novo’, (Kharkiv). Pure cultures of cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* (Lyngh.) Bred. РРMSU strain from the collection of microalgae cultures of the Department of Botany and Plant Ecology of V.N. Karazin Kharkiv National University and *Pseudomonas putida* from the bacteria collection of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine were applied as well.

A. flos-aquae is a planktonic filamentous cyanobacterium capable of diazotrophy. Strains of this species can produce metabolites with plant growth-stimulating activity, such as phytohormones, humic substances, polysaccharides, amino acids, vitamins, etc. [27].

P. putida is a gram-negative rod-shaped bacterium used as a biocontrol agent for diseases and



з колекції бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

A. flos-aquae — планктонна нитчаста ціано-бактерія, здатна до діазотрофії. Штами даного виду можуть продукувати метаболіти, що проявляють рістстимулюючу активність рослин — фітогормони, гумінові речовини, поліцукриди, амінокислоти, вітаміни тощо [27].

P. putida — грамнегативна паличкоподібна бактерія, яка використовується як агент біо-контролю захворювань та стимуляторів росту сільськогосподарських рослин. Разом з іншими корисними ризобактеріями входить до складу діазотрофного блока ґрунтової мікрофлори. Бактерії даного виду можуть продукувати сидеро-фори та деякі фітогормони, а також сприяють солюбілізації корисних речовин. Також штами цього виду володіють механізмами колонізації поверхні коренів рослин, що може позитивно впливати на їх ріст і розвиток [16, 29].

Ціанобактерії культивували на рідкому поживному середовищі такого складу: KNO_3 — 5,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,5; KH_2PO_4 — 1,25; ЕДТА — 0,037 (г/л дистильованої води); розчин мікро-елементів (H_3BO_3 — 2,86 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,81 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,222 г/л; MoO_3 , NH_4VO_3 — сліди) — 1 мл, у люмінастаті за температури $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ та освітленні 2 клк протягом 12 годин. Бактерії *P. putida* культивували на рідкому поживному середовищі м'ясо-пептонний бульйон у термостаті за температури 28°C .

Насіння для експерименту стерилізували протягом 15 хв у 70%-му розчині етилового спирту, після чого трикратно відмивали у стерильній дистильованій воді. Обробку насіння проводили шляхом занурення на 30 хв у 50 мкМ розчин СК (CHIMPRODs.a., Румунія) чи в бактеріальні суспензії (дослідні серії), чи у стерильну водогінну воду (контроль). Для бактеризації використовували окремо суспензії ціанобактерій, *P. putida* чи їх суміш. Використовували культури бактерій, що перебували на початку стаціонарної фази росту і мали кількість колоній утворювальних одиниць $10^7/\text{мл}$. Для отримання однорідної бактеріальної суспензії використовували Vortex V-1 plus (Biosan, Латвія). Горох і квасолю вирощували у рулонах фільтрувального паперу, змоченого стерильною дистильованою водою (по 30 насінин на рулон), у вегетаційно-кліматичній камері протягом 35 діб за температури $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ та освітленні 2 клк протягом 16 годин на добу. Для моделювання дії холодом (4°C) рулони з насінням у різний час вміщували у холодильну камеру на 24 години: першу частину рулонів — одразу після розкладання на-

growth stimulants for agricultural plants. Together with other beneficial rhizobacteria, it is a part of diazotrophic block of soil microflora. Bacteria of this species may produce siderophores and some phytohormones, as well as promote nutrient solubilization. Also, strains of this species have mechanisms for colonizing the surface of plant roots, thereby improving their growth and development [17, 29].

Cyanobacteria were cultured in liquid nutrient medium of following composition: KNO_3 — 5.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 2.5; KH_2PO_4 — 1.25; EDTA — 0.037 (g/l of distilled water); solution of microelements (H_3BO_3 — 2.86 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1.81 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.222 g/l; MoO_3 , NH_4VO_3 — traces) — 1 ml, in a luminostat at $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ and 2 klx illumination for 12 hrs. *P. putida* bacteria were cultured in a liquid nutrient medium (meat-peptone broth) in a thermostat at 28°C .

Seeds for the experiment were sterilized for 15 min in 70% ethyl alcohol solution and then washed thrice in sterile distilled water. Seeds were treated by immersing for 30 min either into a 50 μM solution of SA (CHIMPRODs.a., Romania) or in bacterial suspensions (experimental series), or in sterile tap water (control). Single suspensions of cyanobacteria, *P. putida* or their mixture were applied for bacterization. Bacterial cultures at early stationary growth phase with colony forming unit number of $10^7/\text{ml}$ were used. Homogeneous bacterial suspension was obtained using Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia). Peas and beans were grown in rolls of filter paper moistened with sterile distilled water (30 seeds per roll) in a vegetative and climatic chamber for 35 days at a temperature of $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ and 2 klx illumination for 16 hrs per day. To simulate the exposure to cold (4°C), the rolls with seeds were placed in a refrigerator for 24 hrs at different times: the first part of rolls — immediately after seed spreading; the second one — 7 days after experiment onset (delayed cold exposure); the third one was untreated. Seed germination and growth of young plants were monitored throughout the experiment, and, if necessary, the filter paper of rolls was irrigated with sterile distilled water. At the end of the experiment, morphometric parameters of plants such as: length and wet weight of shoots and roots, cell membrane permeability in leaves, as well as actin filament structure in root cells were measured.

Cell membrane permeability was measured by electrolyte release from leaf cuttings into distilled water using portable conductivity meter 'TDS-3M' (Radelkis, Hungary) at a frequency of 3 kHz. For each replicate of the study, 100 mg of plant leaf cut-



сіння; другу — через 7 діб після початку експерименту (відтермінована дія холодом); третю — не піддавали дії холодового стресу. Протягом усього експерименту спостерігали за проростанням насіння, ростом молодих рослин, та, за потреби, зрошували фільтрувальний папір рулонів стерильною дистильованою водою. Після закінчення експерименту визначали морфометричні показники рослин — довжину і сиру масу пагонів і корінців, проникність клітинних мембран у листках, а також структуру актинових фібрил у клітинах коренів.

Проникність клітинних мембран оцінювали за виходом електролітів із висічок листків у дистильовану воду; вимірювання проводили з використанням портативного кондуктометра «TDS-3M» (Radelkis, Угорщина) за частоти 3 кГц. Для кожного повтору дослідження готували по 100 мг висічок листків рослин. Залишки рослинного соку видаляли шляхом ретельного промивання наважок висічок дистильованою водою і обсушуванням фільтрувальним папером. Обсушені висічки заливали 100 мл дистильованої води і через 18 годин визначали електропровідність екстракту. Після цього ємності з рослинним матеріалом доводили до кипіння на водяній бані, охолоджували до кімнатної температури, доводили об'єм рідини до вихідного і знову вимірювали електропровідність екстрактів. Результат виходу електролітів (показник до нагрівання) розраховували у відсотках від повного виходу (показник після нагрівання).

Дослідження структури актинових фібрил проводили методом конфокальної мікроскопії. Фіксацію зразків корінців проростків здійснювали за використання «The Image-iT® Fixation/Permeabilization», згідно з протоколом до набору реагентів. Візуалізацію здійснювали на конфокальному мікроскопі «Olympus FV10i-LIV» (Olympus, Японія) за умов λ_{Ex} 493 нм/ λ_{Em} 517 нм для детекції комплексу актин-фаллоїдин-iFluor 488. Вимірювали відносну інтенсивність та площу флуоресценції з урахуванням фону та аутофлуоресценції зразків за обома каналами флуоресценції з використанням програмного забезпечення «Olympus CellSense Dimension Desktop 1.18».

Активність ферменту поліфенолоксидази (ПФО) у сирій масі коренів визначали за допомогою спектрофотометра «Ulab 102UV» (Ulab, Китай). Для цього з подрібненого рослинного матеріалу готували витяжку в фосфатному буфері pH 7,4 (Аналіта, Україна), до якої додавали рівні об'єми дистильованої води й 0,02%-го розчину парафенілдіаміну у щавелевій кислоті (PANREAC

tings were prepared. The residual sap was removed by thorough rinsing cutting samples with distilled water and drying them with filter paper. Dried cuttings were poured with 100 ml of distilled water and 18 hrs later the electrical conductivity of extract was measured. After that, containers with plant material were brought to boil in a water bath, cooled down to room temperature, then the liquid volume was reduced to initial one, and electrical conductivity of extract was measured again. The result of electrolyte release (before heating) was calculated as a percentage of the total release (after heating).

The structure of actin filaments was studied by confocal microscopy. Samples of root seedlings were fixed using 'The Image-iT® Fixation/Permeabilization Kit' following the protocol for the reagent kit. Visualization was performed using Olympus FV10i-LIV confocal microscope (Olympus, Japan) at λ_{Ex} 493 nm / λ_{Em} 517 nm to detect the actin-phalloidin-iFluor 488 complex. A relative intensity and fluorescence area were measured taking into account the background and samples' autofluorescence for both fluorescence channels using 'Olympus CellSense Dimension Desktop 1.18' software.

The polyphenol oxidase (PPO) activity in wet weight of roots was determined using a spectrophotometer 'Ulab 102UV' (Ulab, China). For this purpose, an extract was prepared from crushed plant material in phosphate buffer of pH 7.4 (U Analita,kraine), supplemented with equal volumes of distilled water and 0.02% solution of paraphenyl diamine in oxalic acid (PANREAC QUIMICA S.L.U, Spain); one cuvette with reaction mixture was also supplemented with a 0.01N oxalic acid solution, and another one – with 1% pyrocatechol solution in oxalic acid. The PPO activity was determined in kinetic mode at 420 nm wavelength, by recording the oxidation rate with pyrocatechol enzyme for 120 s.

The study included three replicated experiments. In each experiment, all parameters were measured twice. Results of two measurements of each parameter in three replicate experiments were summarized in a single sample ($n = 6$), tested for homogeneity by the method of outlier [4] with calculating the mean value and its standard error (SE) using the Excel software (Microsoft, USA). The mean values were compared between different experimental variants using Tukey's test, considering the difference significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

The impacts of each factor (bacterization, seed treatment with SA, cold exposure) were



QUÍMICA S.L.U, Іспанія), також до реакційної суміші в одну кювету додавали розчин щавелевої кислоти (0,01Н), а до іншої — 1%-й розчин пірокатехіну у щавелевій кислоті. Активність ПФО визначали в кінетичному режимі за довжини хвилі 420 нм, фіксуючи значення швидкості реакції окиснення ферментом пірокатехіну протягом 120 с.

Дослідження складалося з трьох повторних експериментів. У кожному експерименті здійснювали по два вимірювання всіх параметрів. Результати двох вимірювань кожного параметра у трьох повторних експериментах узагальнювали в єдину вибірку ($n = 6$), перевіряли на гомогенність методом викидів [1] з обчисленням середнього значення та його стандартної помилки (SE) за допомогою програми «Excel» (Microsoft, США). Середні значення порівнювали між різними варіантами досліду за допомогою критерію Тьюкі, вважаючи різницю значущою при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Ефекти впливу кожного фактора (бактеризація, обробка насіння СК, дія холоду) оцінювали шляхом порівняння отриманих показників за окремої дії чинника із загальним інтактним контролем (на рисунках позначено як C1) та контролями в межах кожного з варіантів холодового впливу (контролі C2 і C3 відповідно).

Під час аналізу змін маси і довжини рослин у контрольних варіантах C2 і C3 відносно C1 було встановлено, що самотійна дія холоду на насіння не приводила до значущих ростових реакцій рослин гороху чи квасолі (рис. 1–4). За умов відтермінованого холодового впливу відбувалося значуще зниження маси пагонів гороху і квасолі (див. рис. 2), а значуще збільшення ростових показників було встановлено тільки за довжиною коренів рослин квасолі та пагонів гороху (див. рис. 3,В та 4,А відповідно).

За відсутності холодового впливу рістстимулюючий ефект бактеризації чи обробки СК насіння гороху майже не визначався, за винятком збільшення довжини коренів у варіантах з використанням СК чи кожної бактерії окремо (див. рис. 1,А–4,А). Більший відгук на застосування СК чи бактеризацію спостерігався у насіння квасолі (див. рис. 1,В–4,В). Так, за бактеризації насіння квасолі сумішшю суспензій обох видів мікроорганізмів істотно збільшувалась довжина коренів і пагонів та маса пагонів порівняно з контролем C1 (див. рис. 2,В–4,В). Істотне ж зниження показників довжини і маси коренів і пагонів рослин

оцінювали порівнюючи отримані показники з контролем C1 (рис. 1–4) та контролем C2 і C3 (рис. 1–4) відповідно.

При аналізі змін маси і довжини рослин у контрольних варіантах C2 і C3 відносно C1, індивідуальний ефект холоду на насіння не виявився значущим у гороху чи бобових рослин (рис. 1–4). При відтермінованій холодній експозиції маса пагонів гороху і бобових рослин значущо зменшилася (див. рис. 2), а параметри росту значущо збільшилися тільки у довжину коренів бобових рослин і гороху (див. рис. 3,В та 4,А відповідно).

Без холодної експозиції, стимулюючий ефект як бактеризації, так і SA-обробки гороху майже не визначався, окрім збільшення довжини коренів у варіантах з SA або кожним бактерією окремо (див. рис. 1А–4А). Більшій реакції на SA або бактеризацію піддалися бобові насіння (див. рис. 1В–4В). Наприклад, бактеризація бобових насіннєвих суспензій обох типів мікроорганізмів значущо збільшила довжину коренів і пагонів порівняно з контролем C1 (див. рис. 2В–4В). Довжина і маса бобових коренів і пагонів значущо зменшилися при бактеризації монокультурами *A. flos-aquae* або *P. putida* (див. рис. 1В–4В). У варіанті бобових насіннєвих суспензій з SA, показники майже не відрізнялися від контролю (див. рис. 1В, 3В, 4В), окрім збільшення довжини пагонів, яке значущо зменшилося порівняно з контролем C1 (див. рис. 2В). Негативний ефект SA-обробки на довжину пагонів порівняно з контролем C1 також спостерігався у гороху (рис. 2А).

При холодній експозиції і SA-обробці насіння гороху і бобових рослин з бактеризацією обох типів мікроорганізмів, ми виявили різні зміни параметрів росту. Наприклад, SA-обробка гороху збільшила довжину коренів і пагонів порівняно з контролем C2 (див. рис. 2А–4А). Однак, параметри росту гороху в варіанті з відтермінованою холодною експозицією і SA-обробкою майже не відрізнялися від контролю C3 (див. рис. 1А–4А). Бобові насіння з SA-обробкою мали позитивний ефект на масу коренів і пагонів і довжину коренів у варіанті з відтермінованою холодною експозицією, але протилежний ефект спостерігався при миттєвій холодній експозиції порівняно з відповідними контролем C3 і C2 (див. рис. 1В–3В). При використанні гороху з бактеризацією і холодовим стресом, корінь



квасолі відбувалося за умов бактеризації окремо *A. flos-aquae* і *P. putida* (див. рис. 1,В–4,В). У варіанті з обробкою СК насіння квасолі показники майже не відрізнялися від контролю (див. рис. 1,В, 3,В, 4,В), за винятком довжини пагонів рослин, яка була значуще знижена порівняно з контролем С1 (див. рис. 2,В). Також негативний вплив обробки СК на довжину пагонів порівняно з контролем С1 був у гороху (див. рис. 2,А).

За умов холодового впливу та обробки насіння СК і бактеризації як *A. flos-aquae* і *P. putida*, так і їх сумішню, було встановлено дещо інші зміни ростових показників рослин. Так, обробка насіння СК мала наслідком збільшення (порівняно з С2) довжини коренів і пагонів та маси пагонів рослин гороху за умов негайного холодового впливу (див. рис. 2,А; 3,А; 4,А). Проте, майже невідмінними від контролю С3 були ростові показники рослин гороху у варіанті з відтермінованою дією холоду та обробкою насіння СК (див. рис. 2,А; 3,А; 4,А). Обробка насіння квасолі СК позитивно впливала на масу коренів і пагонів та довжину коренів рослин у варіанті з відтермінованою дією холоду, а за негайного холодового впливу спостерігався зворотній ефект порівняно з відповідними контролями С3 і С2 (див. рис. 1,В; 2,В; 3,В). За використання бактеризації насіння гороху та холодового стресу було зниження маси коренів порівняно з відповідними контролями С2 і С3 (див. рис. 1А). Для квасолі зменшення маси коренів рослин порівняно з контролем С2 було встановлено у варіантах з використанням кожної з бактеріальних суспензій та негайної дії холоду (див. рис. 1,В). У варіанті дослід з відтермінованою дією холоду бактеризація позитивно впливала на масу коренів квасолі: показники були вищі за контрольні (див. рис. 1,В). Значущих ефектів бактеризації порівняно з контролями С2 і С3 не

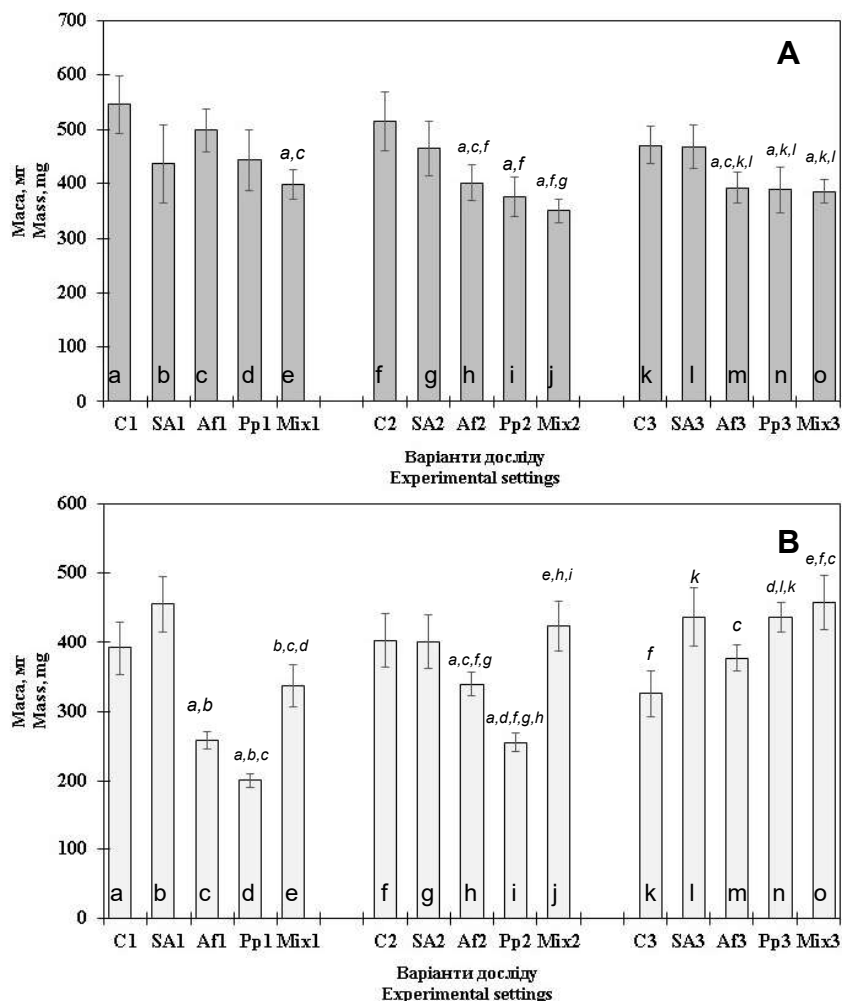


Рис. 1. Ефекти обробки СК чи бактеризації насіння гороху (А) і квасолі (В) на масу коренів за умов холодового стресу: тут і далі С — контроль без інокуляції; SA — обробка саліциловою кислотою; Af — бактеризація *Anabaena flos-aquae*; Pp — бактеризація *Pseudomonas putida*; Mix — бактеризація сумішню суспензій обох видів бактерій; 1 — вирощування рослин без впливу холодом; 2 — негайна дія холодом; 3 — відтермінована дія холодом. Для кращої візуалізації значущості відмінностей стовпці з варіантами впливу на рисунках позначені літерами а, b, с...о; а індексами (а, b, с...о) позначено відповідні варіанти, порівняно з якими спостерігали значущі відмінності ($p \leq 0,05$).

Fig. 1. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on root mass under cold stress: here and further C – control without inoculation; SA – treatment with salicylic acid; Af – bacterization using *Anabaena flos-aquae*; Pp – bacterization using *Pseudomonas putida*; Mix – bacterization using a mixture of suspensions of both bacterial species; 1 – plants grown without exposure to cold; 2 – immediate exposure to cold after treatment; 3 – delayed exposure to cold after treatment. For a better visualization of the significance of the differences, the columns are marked with the letters a, b, c...o; and indexes (a, b, c...o) indicate the corresponding variants compared to which significant differences were observed ($p \leq 0.05$).

weight was decreases as compared to the corresponding controls C2 and C3 (see Fig. 1A). For beans, a reduction of plant root weight as compared to C2 control was found in the variants using each of the bacterial suspensions and immediate cold exposure (see Fig. 1B). In the variant with a delayed cold exposure, the bacterization had a positive effect on bean root weight, i. e. the indices were higher vs. the control (see Fig. 1B). No significant effects of bacterization as compared to C2 and C3 controls were found in terms of pea shoot weight and root length under any

було встановлено за показниками маси пагонів і довжини коренів гороху за будь-якої дії холодного стресу (див. рис. 2,А; 3,А). Маса пагонів квасолі за будь-якої бактеризації зменшувалась у варіанті з негайною дією холодом та за використання суміші бактеріальних суспензій і відтермінованого впливу холоду (див. рис. 2,В). Однак за бактеризації окремо суспензіями *A. flos-aquae* і *P. putida* спостерігалось значуще збільшення маси пагонів квасолі порівняно з контролем С3 (див. рис. 2,В). Також за використання суміші суспензій для бактеризації і негайної дії холоду відбувалося значуще збільшення довжини коренів і пагонів квасолі порівняно з контролем С2 (див. рис. 3,В; 4,В).

Відносні зміни морфометричних параметрів у квасолі за негайної і відтермінованої дії холоду були різноспрямованими у деяких варіантах досліджу, а саме за масою пагонів при обробці СК чи *A. flos-aquae*, за масою коренів і пагонів при обробці *P. putida*. У випадку гороху така розбіжність в ефектах негайної та відтермінованої дії холоду визначилася під час порівняння варіантів з обробкою СК за довжиною пагонів, а з обробкою *A. flos-aquae* — за їх масою.

За умов гіпотермії відбувалося зниження співвідношення довжини та маси пагона і кореня рослин (відносно інтактного контролю), що може свідчити про відтік поживних речовин у корінь. Причому означений ефект певною мірою посилювався за умов бактеризації насіння. Це може бути зумовлене здатністю бактерій (ймовірно, через синтез біологічно активних речовин) інтенсифікувати реакції рослин у відповідь на абіотичний стрес. Адже відомо, що бактеріям роду *Pseudomonas* притаманні механізми прискореної реакції на холодний стрес — через зміну текучості клітинних мембран, синтез антифризних білків, каротиноїдних та інших пігментів, речовин вторинного метаболізму з кріопротекторними властивостями, летких активних речовин (алкени, аміди, естери, кетони, сполуки сірки) [8, 31]. Також відома

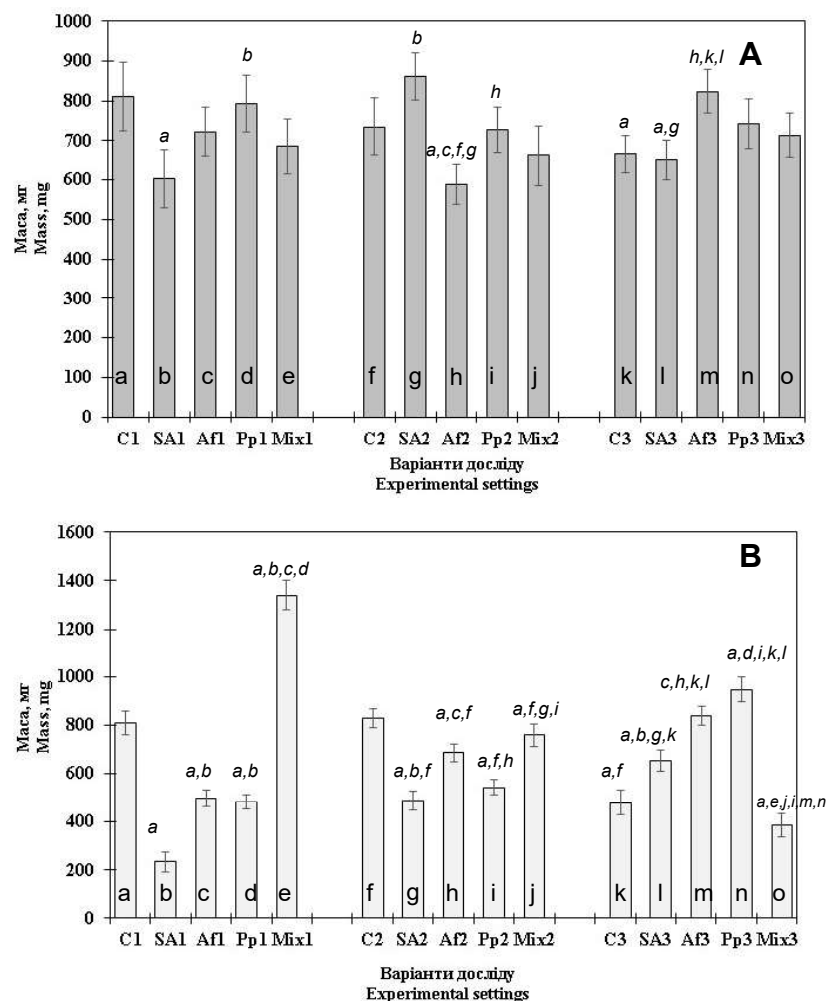


Рис. 2. Ефекти обробки СК чи бактеризації насіння гороху (А) і квасолі (В) на масу пагонів за умов холодного стресу: позначення див. на рис. 1.
Fig. 2. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on sprout mass under cold stress: see Fig. 1 for explanations.

of cold exposures (see Fig. 2A, 3A). The shoot weight of bean under any bacterization was reduced in the variant with immediate cold exposure and when using a mixture of bacterial suspensions and delayed exposure to cold (see Fig. 2B). However, when bacterized with pure suspensions of *A. flos-aquae* and *P. putida*, a significant increase in bean shoot weight was observed as compared to C3 control (see Fig. 2B). When using a mixture of suspensions for bacterization and an immediate cold exposure, the root and shoot length of beans was also significantly augmented vs. the C2 control (see Fig. 3B, 4B).

Relative changes in morphometric parameters in beans under immediate and delayed cold exposure were multidirectional in some experimental variants, namely, by shoot weight under treatment with SA or *A. flos-aquae*, and by root and shoot weight when treated with *P. putida*. As for pea, such a difference in the effects of immediate and



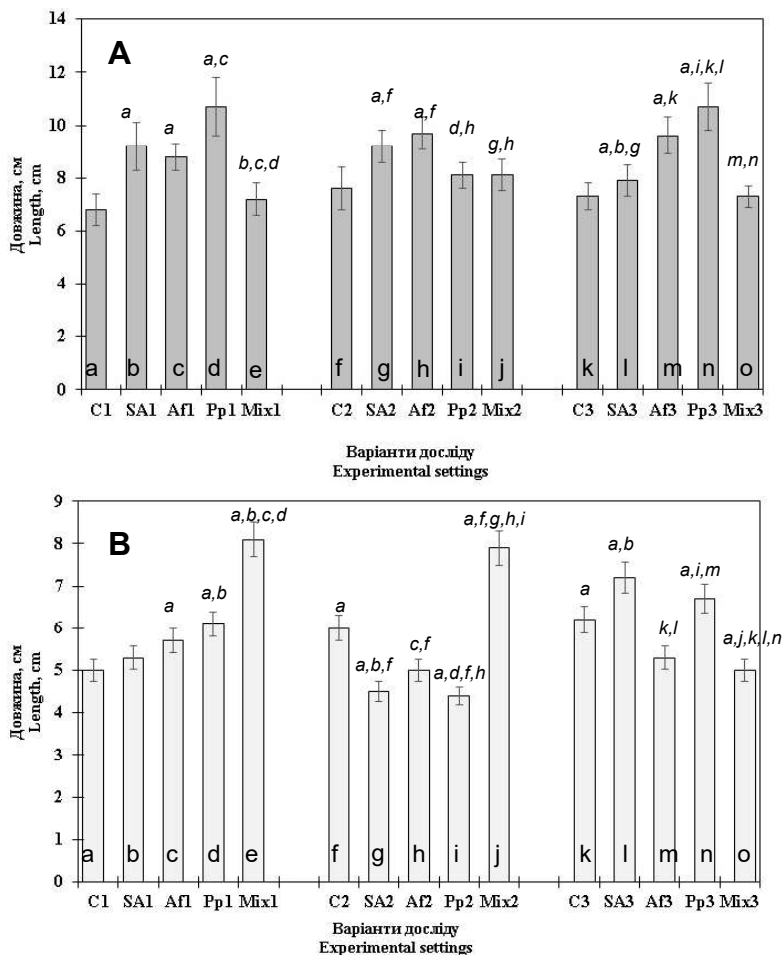


Рис. 3. Ефекти обробки СК та бактеризації насіння гороху (А) і квасолі (В) на довжину коренів за умов холодного стресу: позначення див. на рис. 1.

Fig. 3. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on root length under cold stress: see Fig. 1 for explanations.

здатність даних бактерій виробляти фітогормони та фітогормонподібні речовини, що впливають як на проростання насіння, так і на розвиток кореневої системи, зокрема, її архітектуру [4, 14]. Ціанобактерії, зокрема представники роду *Anabaena*, продукують фітогормони, каротиноїди, вітаміни та інші біологічно активні речовини, які можуть позитивно впливати на подолання рослинами холодного стресу [6, 28]. Окрім того, бактеризація корисними штамми бактерій може оптимізувати рівень клітинних метаболітів (антоціанінів та вільного проліну) та впливати на загальний вміст хлорофілу, фенолів, крохмалю, фізіологічно доступного заліза, білків, амінокислот, а у випадку діазотрофів — продуктів біологічної фіксації азоту. Такий вплив пом'якшує протікання холодного стресу у рослин [21]. Встановлений у нашому дослідженні певний протихолодовий ефект СК збігається з даними літератури [2, 15].

delayed cold exposure was revealed when comparing the variants of treatment with SA by shoot length, and with *A. flos-aquae* – by their mass.

Under hypothermia, the ratio of length and weight of plant shoot and root reduced (relative to the intact control), which might evidence an outflow of nutrients to the root. Moreover, this effect was to some extent enhanced under seed bacterization. This may be due to the ability of bacteria (probably through the synthesis of biologically active substances) to intensify plant responses to abiotic stress. The *Pseudomonas* bacteria are known to have the mechanisms of accelerated response to cold stress: through changes in cell membrane fluidity, synthesis of antifreeze proteins, carotenoid and other pigments, secondary metabolism substances with cryoprotective properties, volatile active substances (alkenes, amides, ethers, ketones, sulfur compounds) [10, 31]. The ability of these bacteria to produce phytohormones and phytohormone-like substances that affect both seed germination and root system development and architecture, in particular, is also known [1, 15]. Cyanobacteria, especially *Anabaena* representatives, produce phytohormones, carotenoids,

vitamins, and other biologically active substances that can positively affect the cold stress tolerance in plants [8, 28]. In addition, bacterization with beneficial bacterial strains can optimize the level of cellular metabolites (anthocyanins and free proline) and affect the total content of chlorophyll, phenols, starch, physiologically available iron, proteins, amino acids, and, in the case of diazotrophs, products of biological nitrogen fixation. This effect mitigates cold stress in plants [22]. The certain anti-cold effect of SA found in our study coincides with the reported data [5, 16].

The cell membrane is the main target of environmental stressors. Cold affects the membrane conformation and properties, thereby disrupting cellular homeostasis. Maintaining the integrity and fluidity of cytoplasmic membranes is a necessary condition for ensuring plant survival under adverse environmental conditions [26]. Cell membrane permeability is a sensitive index of negative effect of hypothermia on plant organism,



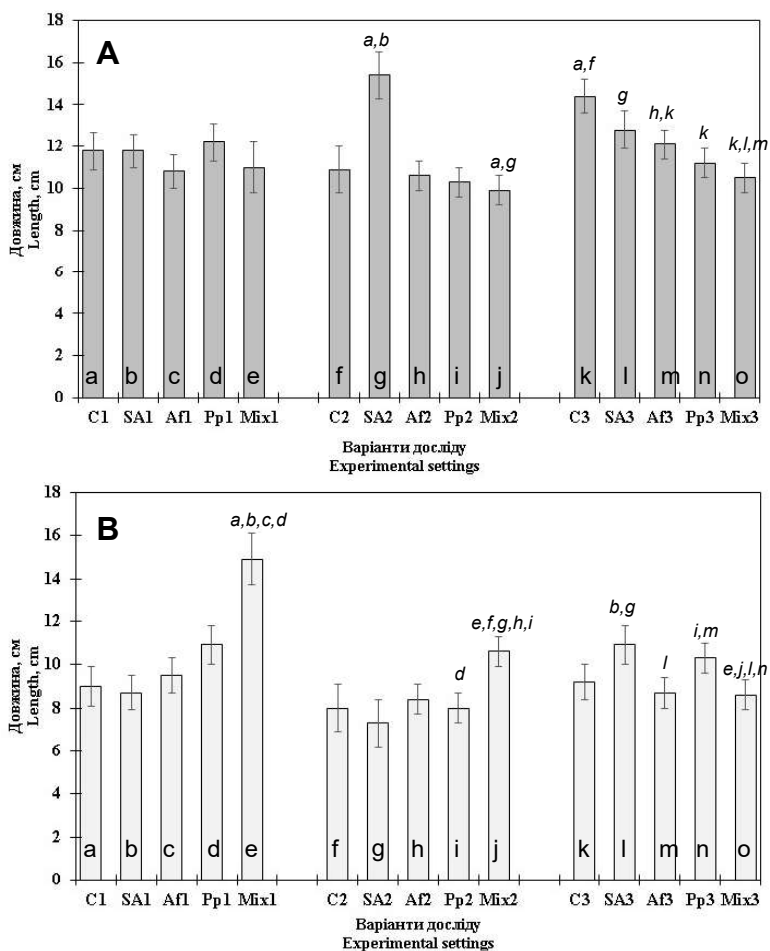


Рис. 4. Ефекти обробки СК та бактеризації насіння гороху (А) і квасолі (В) на довжину пагонів за умов холодного стресу: позначення див. рис. 1.

Fig. 4. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on sprout length under cold stress: see Fig. 1 for explanations.

Цитоплазматична мембрана клітин є основною мішенню стресових факторів навколишнього середовища. Холод впливає на конформацію та властивості мембран, тим самим порушуючи клітинний гомеостаз. Підтримка цілісності та плинності цитоплазматичних мембран є необхідною умовою для забезпечення виживання рослин під час несприятливих умов середовища [25]. Чутливим показником негативного впливу гіпотермії на рослинний організм є проникність клітинних мембран, яку можна оцінити за виходом електролітів. Результати визначення впливу бактеризації насіння чи його обробки СК на проникність клітинних мембран у листках пророщених дослідних рослин за умов холодного стресу представлені на рис. 5. Аналіз отриманих даних показав, що дія холодом (як негайна, так і відтермінована) істотно не впливала на проникність клітинних мембран у листках гороху (порівняння показників у варіантах C1, C2 і C3). На відміну від го-

which can be assessed by electrolyte release. The Fig. 5 shows the results of determining the impact of seed bacterization or SA treatment on cell membrane permeability in leaves of germinated experimental plants under cold stress. The analysis of findings showed the cold effect (both immediate and delayed) not to significantly affect the cell membrane permeability in pea leaves (comparing the parameters in variants C1, C2 and C3). In contrast to peas, bean plants were more sensitive to cold impact: comparing the parameters in variants C1, C2 and C3; Fig. 5B. When growing plants without cold exposure, the electrolyte release decreased with the use of *P. putida* in pea leaf cells (see Fig. 5A), but in beans it did with a mixture of bacterial suspensions (see Fig. 5B). In a variant with immediate cold exposure, the electrolyte release from pea leaf cells was significantly reduced under seed bacterization with *A. flos-aquae* suspension as compared to C2 control (see Fig. 5A). Bacterization of seeds of both plants with *P. putida* suspension, and bean seeds with a mixture of bacterial suspensions also had a positive effect on permeability of leaf cell membranes in variants with delayed cold exposure (Fig. 5).

The treatment with SA or a mixture of suspensions did not produce a similar effect. On the contrary, in variants of plant seed treatment with SA with no cold stress, a significant increase in electrolyte release from leaf cells was observed (Fig. 5). However, under delayed cold exposure, pretreatment with SA promoted a decrease in cell membrane permeability of bean leaves (Fig. 5B). Thus, the observed reduction in cell membrane permeability in pea and bean leaves under seed bacterization and cold exposure testifies to a positive effect of cyanobacteria and *P. putida* on cold tolerance development in experimental plants. In fact, Bhat *et al.* [9] estimated the irreversibility of damaging effect of low temperatures (4°C) by electrolyte leakage in legume leaves.

Changes in fluidity and permeability of cell membranes in plant organisms under cold effect through activation of ion channels can induce cytoskeletal rearrangements [21]. Under cold impact, they can both act as a target and perform a signaling function to activate stress response mechanisms



роху, рослини квасолі виявилися чутливішими до дії холоду: порівняння показників у варіантах C1, C2 і C3 (рис. 5,B). За умов вирощування рослин без холодого впливу зниження виходу електролітів із клітин листків рослин гороху відбувалося за використання *P. putida* (див. рис. 5,A), а у випадку квасолі — суміші бактеріальних суспензій (див. рис. 5,B). У варіанті досліді з використанням негайного холодого впливу істотне зниження виходу електролітів з клітин листових пластин гороху відбувалося за умов бактеризації насіння суспензією *A. flos-aquae* порівняно з контролем C2 (див. рис. 5,A). Бактеризація ж суспензією *P. putida* насіння обох рослин та сумішню бактеріальних суспензій насіння квасолі також позитивно впливала на проникність мембран клітин листків у варіантах з відтермінованою дією холоду (рис. 5). Обробка СК чи сумішню суспензій подібного ефекту не давала. Навпаки, у варіантах з обробкою насіння рослин СК без холодого стресу спостерігали істотне підвищення виходу електролітів з клітин листків (рис. 5). Проте за відтермінованої дії холодом попередня обробка СК сприяла зниженню проникності мембран клітин листків квасолі (рис. 5B). Таким чином, встановлене зниження проникності клітинних мембран у листках гороху та квасолі за бактеризації насіння та дії холоду свідчить про позитивний вплив ціанобактерій і *P. putida* на розвиток холодостійкості дослідних рослин. Адже у роботі К.А. Bhat та співавт. [7], за витоком електролітів у листках бобових рослин було оцінено незворотність пошкоджуючої дії низьких температур (4°C).

Зміни текучості та проникності клітинних мембран рослинних організмів за дії холоду через активацію іонних каналів можуть викликати трансформації цитоскелетних структур [20]. За дії холоду вони можуть як виступати в ролі мішені, так і виконувати сигнальну функцію задля активації механізмів протидії стресу [17]. За відсутності холодого впливу інтенсивність флуоресценції актинових фібрил у клітинах коренів гороху істотно збільшувалась порівняно з контролем C1 як після обробки насіння СК,

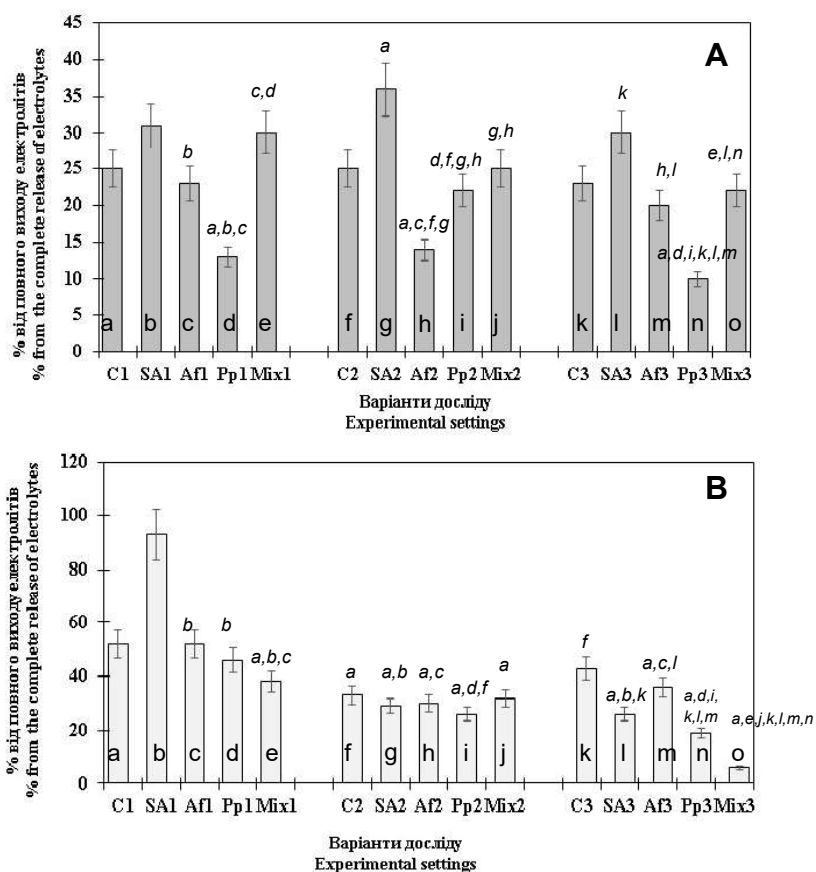


Рис. 5. Ефекти обробки СК та бактеризації насіння гороху (A) і квасолі (B) на проникність клітинних мембран в листках за умов холодого стресу: позначення див. рис. 1.

Fig. 5. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on cell membrane permeability in leaves under cold stress: see Fig. 1 for explanations.

[18]. Under no cold exposure, the fluorescence intensity of actin filaments in pea root cells increased significantly as compared to C1 control both after SA seed treatment and following bacterization (Fig. 6A). In case of beans, no such effect was observed, i. e. the indices in the experiment were at the control C1 level (Fig. 6B). Moreover, these indices in almost all experimental variants did not differ significantly from the control C2 under immediate cold exposure to seeds of both plants (Fig. 6). Under delayed cold exposure, the intensity of actin filament fluorescence in roots of pea seedlings significantly increased vs. C2 control in variants treated with SA, *P. putida* suspension, or bacterial mixture (Fig. 6A). Under similar conditions of bean cultivation, a decrease in fluorescence intensity was observed in all the experimental variants as compared to C2 control (Fig. 6B). In pea root cells, the fluorescence area of actin filaments significantly reduced under cold exposure (C2 and C3 compared to C1), but no similar effect was observed in bean root ones

так і після бактеризації (рис. 6,А). У випадку квасолі подібного ефекту не спостерігали: показники у досліді були на рівні контролю С1 (рис. 6,В). Також означені показники майже в усіх варіантах досліді істотно не відрізнялися від контролю С2 за умов негайної дії холодом на насіння обох рослин (рис. 6). За відтермінованого холодного впливу інтенсивність флуоресценції актинових фібрил у коренях проростків гороху порівняно з контролем С2 значуще збільшувалася у варіантах з обробкою СК, суспензією *P. putida* або сумішшю бактерій (рис. 6,А). За аналогічних умов вирощування квасолі спостерігали зниження інтенсивності флуоресценції у всіх варіантах досліді порівняно з контролем С2 (рис. 6,В). Показник площі флуоресценції актинових фібрил у клітинах коренів гороху істотно знижувався за дії холоду (С2 і С3 порівняно з С1), але за результатами визначення даного показника в клітинах коренів квасолі аналогічного ефекту не спостерігали (рис. 7). У цілому, площа флуоресценції актинових фібрил у клітинах коренів гороху у варіантах з обробкою СК чи бактеризацією при відсутності холодного впливу зменшувалась порівняно з контролем С1 (рис. 7,А). В аналогічному варіанті досліді з квасолею значуще зниження даного показника порівняно з контролем С1 відбувалося за умов обробки СК і бактеризації насіння сумішшю суспензій *A. flos-aquae* і *P. putida* (рис. 7,В). За обох режимів холодного впливу показник площі флуоресценції актинових фібрил у клітинах коренів гороху переважно не відрізнявся від відповідних показників у контролях С2 і С3 (рис. 7,А). Винятком були варіанти з бактеризацією насіння гороху сумішшю бактеріальних суспензій і негайної дії холодом та обробкою насіння гороху СК і відтермінованою дією холоду (рис. 7,А). У досліді на квасолі значуще зниження показника площі флуоресценції актинових фібрил відбувалося за відтермінованої дії холоду та будь-якого виду бактеризації (рис. 7,В). Підвищення інтенсивності або збільшення площі флуоресценції актинових фібрил може свідчити про посилення полімеризації актину. Отже, встанов-

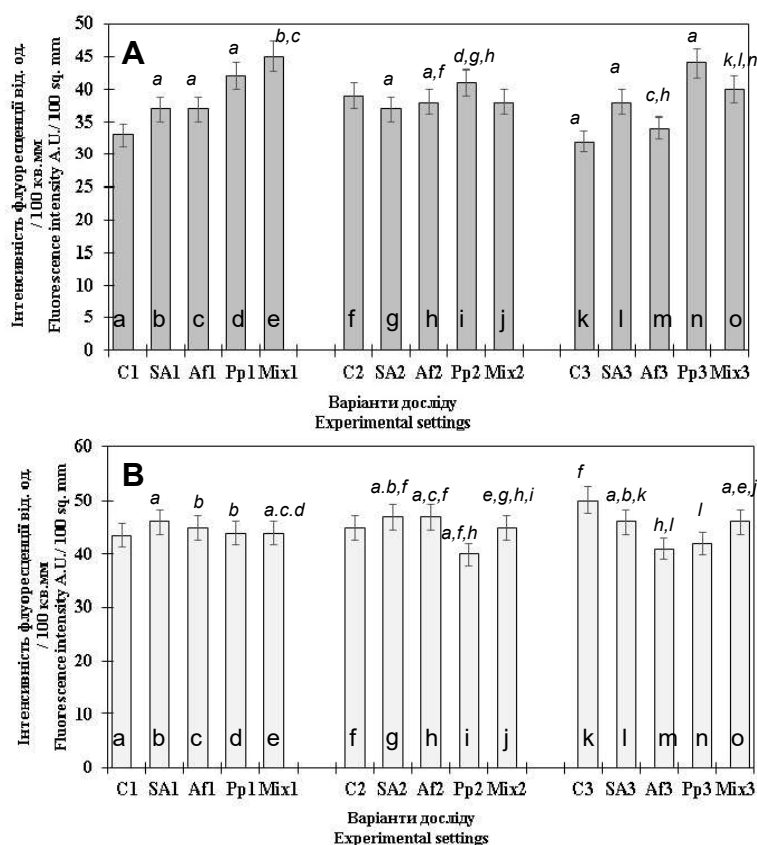


Рис. 6. Ефекти обробки СК та бактеризації насіння гороху (А) і квасолі (В) на інтенсивність флуоресценції актинових фібрил клітин коренів за умов холодного стресу: позначення див. на рис. 1.

Fig. 6. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on fluorescence intensity of actin filaments in root cells under cold stress: see Fig. 1 for explanations.

(Fig. 7). In general, the fluorescence area of actin filaments in pea root cells in the variants with either SA treatment or bacterization with no cold exposure was decreased as compared to C1 control (Fig. 7A). In a similar experiment with beans, this index was significantly decreased as compared to C1 control under SA treatment and seed bacterization with a mixture of *A. flos-aquae* and *P. putida* suspensions (Fig. 7B). Under both modes of cold exposure, the fluorescence area of actin filaments in pea root cells did not differ from the corresponding values in C2 and C3 controls (Fig. 7A). The exceptions were the variants of pea seed bacterization with a mixture of bacterial suspensions and immediate exposure to cold, and pea seed treatment with SA and delayed exposure to cold (Fig. 7A). In the experiments in beans, the fluorescence area of actin filaments was significantly reduced under delayed cold exposure and any type of bacterization (Fig. 7B). An increased intensity or augmented area of actin filament fluorescence may indicate a rise in actin polymerization. Thus, the observed effects suggest



лені ефекти дозволяють припустити певну позитивну роль бактеризації насіння та обробки СК у збереженні цілісності цитоскелетних елементів клітин кореня гороху внаслідок відтермінованого холодного стресу. Таким чином, вимірювання інтенсивності флуоресценції актинових фібрил у клітинах кореня може бути інформативним для оцінки протекторних ефектів бактеризації чи використання інших криопротекторів. Прямі механізми позитивного впливу ризосферних мікроорганізмів на стан мембран та цитоскелетні структури рослинних клітин за дії холоду на сьогодні невідомі. Проте є можливим опосередкований вплив ризосферних бактерій на численні метаболічні реакції, поглинання поживних речовин рослинним організмом, співвідношення Na^+/K^+ у коренях, що сприяє захисту рослин від небажаних холодних реакцій [22].

Відомо, що зміни активності ферменту ПФО є показовими за розвитку індукованої прикореневими бактеріями системної резистентності до несприятливих факторів середовища [24]. Окрім того, підвищення активності ПФО в коренях рослин може виступати опосередкованим маркером встановлення взаємовідносин у системі рослина-мікроорганізм. Результати визначення активності ферменту ПФО в коренях гороху і квасолі представлено на рис. 8А, В. За будь-якого варіанту холодного впливу не відбувалося значущої зміни активності ПФО в коренях обох видів рослин (порівняння контролів С1, С2 і С3), за винятком відтермінованої холодової дії на горох, коли спостерігалось значуще зниження активності ПФО (порівняння між С1 і С3). Також встановлено зниження активності ферменту за обробки насіння гороху СК або суспензіями ціанобактерій і *P. putida* за відсутності холодного впливу порівняно з контролем С1 (рис. 8,А). Зниження активності ПФО в коренях гороху порівняно з контролем С2 відбувалося й за негайної дії холодом після обробки насіння СК чи бактеризації *A. flos-aquae* (рис. 8,А). Значуще підвищення активності ферменту порівняно з контролем С3 відбувалося в основному тільки у варіанті з бактеризацією насіння гороху сумішшю бактеріальних суспензій та від-

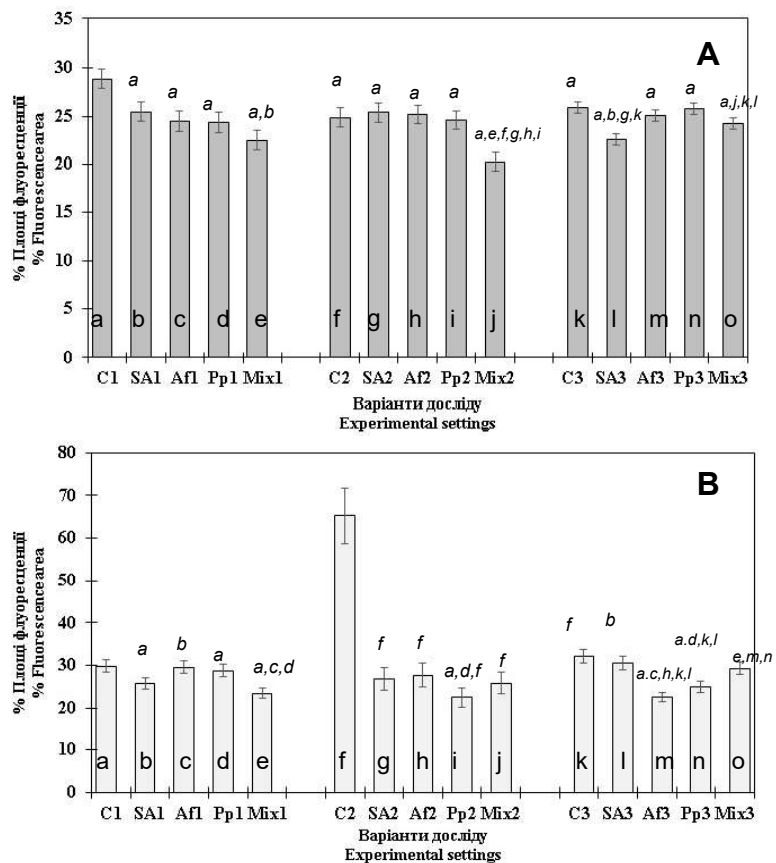


Рис. 7. Ефекти обробки СК та бактеризації насіння гороху (А) і квасолі (В) на площу флуоресценції актинових фібрил клітин коренів за умов холодного стресу: позначення див. рис. 1.

Fig. 7. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on fluorescence area of actin filaments in root cells under cold stress: see Fig. 1 for explanations.

a certain positive role of seed bacterization and SA treatment in preserving integrity of cytoskeletal elements in pea root cells after delayed cold stress. Hence, measuring the fluorescence intensity of actin filaments in root cells may be informative in evaluating protective effects of bacterization or if using other cryoprotectants. Direct mechanisms of positive effect of rhizospheric microorganisms on membrane state and cytoskeletal structures in plant cells under cold exposure are still unknown. However, an indirect effect of rhizospheric bacteria on numerous metabolic reactions, nutrient uptake by plant organism, and Na^+/K^+ ratio in roots is possible, thus promoting plant protection against undesirable cold responses [23].

It is known that changes in PPO activity are indicative in development of systemic resistance induced by root bacteria to adverse environmental factors [25]. In addition, an increased PPO activity in plant roots can act as an indirect marker of establishing relationships in plant-microorganism

термінованого холодового впливу (рис. 8А). За холодового впливу на квасолі активність ферменту ПФО істотно не відрізнялась порівняно з відповідним контролем С2 чи С3 або значуще знижувалась за умов обробки насіння СК чи бактеризації окремо *A. flos-aquae* і *P. putida* (рис. 8,В). Попри те, що існує значна кількість даних щодо функціонування ПФО в різних органах різних видів рослин, чіткі механізми, що регулюють активність цього ферменту, досі невідомі. Найчастіше повідомлялося, що зниження активності ПФО відбувається за дії низьких чи високих температур, а її підвищення — у відповідь на контакт з фітопатогенами чи іншими біотичними стресорами [32].

Для повнішої оцінки ефектів обробки СК чи бактеризації насіння було проаналізовано характер змін досліджуваних показників у гороху і квасолі за різних способів холодового впливу (негайного чи відтермінованого). Виявилось, що для гороху спільними ефектами обробки СК за різних умов дії холоду були збільшення проникності мембран і зниження активності ПФО. За бактеризації насіння гороху бактеріальними суспензіями окремих видів чи їх сумішню схожим чином для негайної та відтермінованої дії холоду проявлялося зменшення маси коренів, а у варіанті з *A. flos-aquae* — ще й збільшення їх довжини. Для квасолі спільними ефектами за обох варіантів дії холоду було зниження активності ПФО (варіант з обробкою СК), зменшення площі флуоресценції актинових фібрил (за бактеризації *A. flos-aquae*), інтенсивності й площі флуоресценції актинових фібрил (за обробки *P. putida*), а за бактеризації сумішню суспензій *A. flos-aquae* і *P. putida* відбувалося зниження маси пагонів.

Привертає увагу той факт, що зміни морфометричних параметрів рослин квасолі за негайної і відтермінованої дії холоду були різноспрямованими у деяких варіантах досліді. Зокрема, такий ефект різноспрямованості спостерігався при обробці СК чи використанні *A. flos-aquae* (за масою пагонів), за бактеризації насіння *P. putida* (за масою коренів і пагонів). У випадку гороху така розбіжність в ефектах негайної та відтермінованої дії холоду іс-

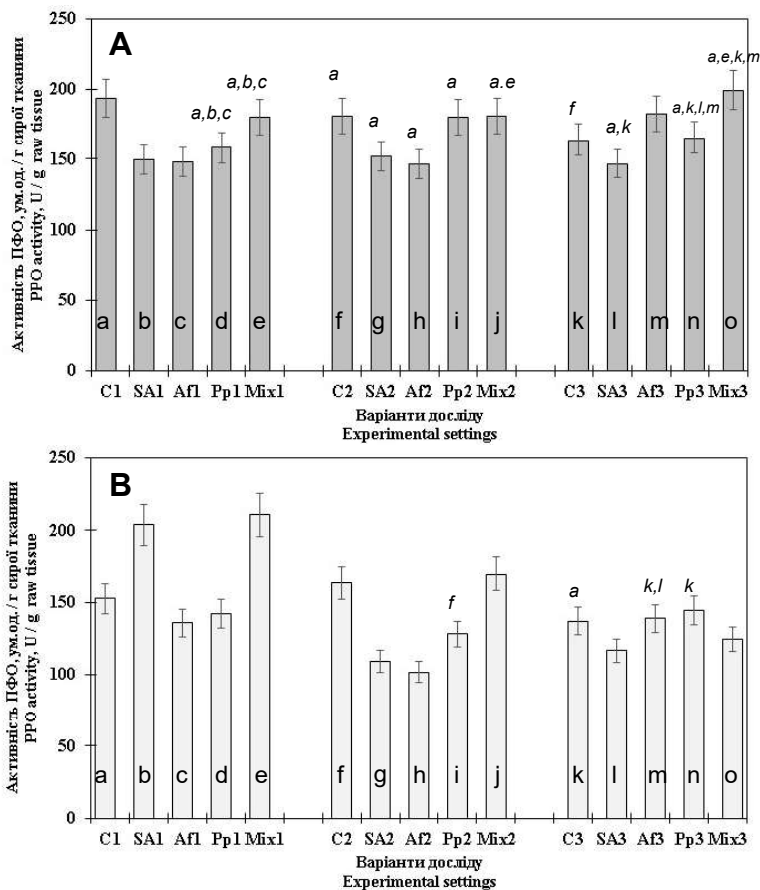


Рис. 8. Ефекти обробки СК та бактеризації насіння гороху (А) і квасолі (В) на активність ферменту поліфенолоксидази в коренях за умов холодового стресу: позначення див. рис. 1.

Fig. 8. Effects of SA treatment or bacterization of pea (A) and bean (B) seeds on polyphenol oxidase activity in roots under cold stress: see Fig. 1 for explanations.

system. The results of determining the PPO activity in pea and bean roots are shown in Fig. 8. Under any variant of cold exposure, there was no significant change in PPO activity in roots of both plant species (comparison of C1, C2, and C3 controls), excepting the peas and delayed cold exposure, where a significant decrease in PPO activity was observed (comparison between C1 and C3). A decrease in enzyme activity was also found when treating pea seeds with either SA or suspensions of cyanobacteria and *P. putida* with no cold exposure as compared to C1 control (Fig. 8A). The PPO activity in pea roots was also reduced as compared to C2 control under immediate cold exposure after seed treatment with SA or bacterization with *A. flos-aquae* (Fig. 8A). The enzyme activity was significantly increased as compared to C3 control only in the variant with pea seed bacterization with a mixture of bacterial suspensions and delayed cold exposure (Fig. 8A). Under cold exposure in beans, the PPO activity either did not differ significantly as compared



нувала під час порівняння варіантів з обробкою СК за довжиною пагонів, а з бактеризацією *A. flos-aquae* за масою пагонів.

Схожими ефектами обробки насіння гороху і квасолі та негайної дії холоду були: за обробки СК — зниження активності ПФО; за бактеризації *A. flos-aquae* — зниження маси коренів і пагонів та активності ПФО; за бактеризації *P. putida* — зниження маси коренів; за використання суміші бактеріальних суспензій — зменшення площі флуоресценції актинових фібрил. Відтермінований холододовий вплив приводив до схожих змін для гороху і квасолі у варіантах дослідів з обробкою насіння СК у вигляді зниження активності ПФО, з обробкою *A. flos-aquae* — зростання маси пагонів, а з обробкою *P. putida* — зниження проникності мембран.

Отже, отримані нами дані можуть свідчити про перспективність використання СК та бактеризації насіння бобових рослин ціанобактеріями та представниками ризобактерій для зменшення пошкоджень, спричинених холодом. Але для остаточного висновку щодо використання *A. flos-aquae*, *P. putida* чи їх комбінації необхідно продовження дослідів із застосуванням ґрунтової культури у триваліших вегетативних та польових умовах. Також за результатами вимірювань тривалої динаміки фізіолого-біохімічних показників росту і розвитку різних видів бобових рослин після бактеризації чи обробки СК і холододового впливу можна буде зробити висновки щодо можливостей відновлення певних функцій рослинного організму по закінченню дії низьких позитивних температур. В цілому ж, можливим механізмом позитивних ефектів бактеризації насіння сільськогосподарських рослин активними штамами бактерій є сукупність різноманітних відповідей рослинного організму на присутність мікроорганізмів. Адже однією зі стратегій покращення системи захисту рослин від стресових факторів є «праймування» шляхом використання м'якого стресора, зокрема, біотичного агента [11]. Присутність бактерій на поверхні насіння, а потім і на проростках може виступати фактором, що стимулює адаптивну відповідь шляхом ініціації багатьох сигнальних шляхів у рослинному організмі.

Висновки

1. Ростові реакції різних за холодостійкістю рослин гороху і квасолі на дію холоду мали переважно різноспрямований характер.

to the corresponding control C2 or C3, or significantly decreased under seed treatment with SA or bacterization with *A. flos-aquae* and *P. putida* (Fig. 8B). Despite the fact that many data are available on PPO functioning in different organs of various plant species, the exact mechanisms that regulate this enzyme activity are still unknown. Most often, PPO activity has been reported to decrease when exposed to low or high temperatures, and to increase in response to contact with phytopathogens or other biotic stressors [32].

To assess more thoroughly the effects of SA treatment or seed bacterization, we analyzed the character of changes in the studied parameters in peas and beans under different ways of cold exposure (immediate or delayed). It was found that for peas, the common effects of SA treatment under different conditions of cold exposure were an increase in membrane permeability and a decrease in PPO activity. When pea seeds were treated with bacterial suspensions of pure species or their mixture, a similar decrease in root mass was observed for immediate and delayed cold exposure, and in the variant with *A. flos-aquae*, their length was also increased. For beans, under both cold exposures the common effects were a decrease in PPO activity (variant with SA treatment), reduction of fluorescence area of actin filaments (under *A. flos-aquae* bacterization), diminished intensity and area of actin filament fluorescence (under *P. putida* treatment), but when bacterized with a mixture of *A. flos-aquae* and *P. putida* suspensions, there was a decrease in shoot mass.

Notably, that the changes in morphometric parameters of bean plants under immediate and delayed cold exposure were multidirectional in some experimental variants. In particular, this multidirectional effect was identified by shoot mass under SA treatment or using *A. flos-aquae*, and by root and shoot mass when treating seeds with *P. putida*. For peas, such a difference in the effects of immediate and delayed cold exposure was observed when comparing the SA treatment by shoot length, and bacterization with *A. flos-aquae* by shoot mass.

The similar effects of seed treatment for peas and beans and immediate cold exposure were as follows: a decrease in PPO activity under SC treatment; a reduction of root and shoot weight and PPO activity under bacterization with *A. flos-aquae*; a decrease in root mass under treatment with *P. putida*; a decrease in fluorescence area of actin filaments when using a mixture of bacterial suspensions. In peas and beans, the delayed cold exposure resulted in similar changes such



2. Обробка насіння розчином СК позитивно впливала на холодостійкість гороху у варіанті досліду з негайною дією холоду. Проте попередня обробка насіння суспензіями бактерій або їх сумішшю сприяла розвиненню холодостійкості квасолі у варіантах досліду з відтермінованим впливом холоду.

3. Бактеризація насіння переважно знижувала проникність клітинних мембран у листках рослин гороху та квасолі.

4. За відтермінованого холодового впливу у варіантах досліду з бактеризацією ціанобактеріями чи сумішшю двох мікроорганізмів активність ПФО в коренях рослин гороху збільшувалася, а в коренях рослин квасолі, навпаки, знижувалася.

5. Інтенсивність і площа флуоресценції актинових фібрил у коренях рослин гороху і квасолі була більш відмінною від показників у контролі за умов відтермінованого холодового впливу. Інтенсивність флуоресценції актинових фібрил у коренях гороху різною мірою збільшувалася у рослин, оброблених суспензією *Pseudomonas putida*, як за негайної дії холоду, так і у варіанті з відтермінованим холодовим впливом.

Автори статті висловлюють подяку Коту Юрію Григоровичу, к.б.н., доценту кафедри біохімії Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, за допомогу в проведенні досліджень на конфокальному мікроскопі.

Література

1. Атраментова ЛО, Утевська ОМ. Статистичні методи в біології. Харків: ХНУ імені В.Н. Каразіна; 2007. 288 с.
2. Колупаев ЮЕ, Ястреб ТО, Шклярєвський МА, та ін. Саліцилова кислота: синтез і стрес-протекторні ефекти у рослин. Вісник харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. 2021; (2): 6–22.
3. Шевчук ОА, Кравчук ГІ, Вергеліс ВІ, та ін. Вплив стимулюючих препаратів на морфометричні показники проростків та посівні якості насіння квасолі. Сільське господарство та лісівництво. 2019; (12): 225–32.
4. Abo-Shady AM, Osman MEH, Gaafar RM, et al. Cyanobacteria as a valuable natural resource for improved agriculture, environment, and plant protection. Water Air Soil Pollut. 2023 May 4 [cited 2024 Jul 24]; 234(5): 313. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-023-06331-7>
5. Acuña-Rodríguez IS, Newsham KK, Gundel PE, et al. Functional roles of microbial symbionts in plant cold tolerance. Ecol Lett. 2020; 23(6): 1034–48.
6. Alvarez AL, Weyers SL, Goemann HM, et al. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. Algal Research. 2021 Feb 9 [cited 2024 Jul 24]; 54: 102200. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926421000199>

as: a decrease in PPO activity in experimental variants with SA seed treatment, an increase in shoot mass when treated with *A. flos-aquae*, and a decrease in membrane permeability under *P. putida* treatment.

Thus, our findings may show the prospects of the use of SA and bacterization of legume seeds with cyanobacteria and rhizobacteria to reduce cold damages. However, further experiments using soil culture under longer vegetative and field conditions are needed to make a final conclusion on the use of *A. flos-aquae*, *P. putida* or their combination. Also, based on measurements of long-term dynamics of physiological and biochemical parameters of growth and development of different legume species after bacterization or SA treatment and cold exposure, it will be possible to conclude whether certain functions of plant organism can be restored after exposure to low positive temperatures. In general, a possible mechanism of positive effects of bacterization of agricultural plant seeds with active bacterial strains is a combination of various responses of plant organism to the presence of microorganisms. In fact, one of the strategies for improving the plant protection system against stress factors is ‘priming’ by using a mild stressor, in particular, a biotic agent [13]. The presence of bacteria on seed surface, and then on seedlings, can act as a factor that stimulates an adaptive response by initiating many signalling pathways in plant organism.

Conclusions

1. Growth responses of pea and bean plants with different tolerance to cold exposure were mostly multidirectional.

2. Seed treatment with SA solution had a positive effect on cold tolerance of peas in experiment with immediate cold exposure. However, pre-treatment of seeds with bacterial suspensions or their mixture promoted the development of cold tolerance of beans in the experimental variants with delayed exposure to cold.

3. Seed bacterization mostly reduced the permeability of cell membranes in pea and bean leaves.

4. Under delayed cold exposure in experimental variants with bacterization using cyanobacteria or a mixture of two microorganisms, PPO activity in pea roots increased, but in bean ones, on the contrary, decreased.

5. The intensity and fluorescence area of actin filaments in pea and bean roots were more different from those in the control under delayed cold exposure. The fluorescence intensity of actin filaments in pea roots increased to a different extent



7. Bhat KA, Mahajan R, Pakhtoon MM, et al. Low temperature stress tolerance: An insight into the omics approaches for legume crops. *Front Plant Sci.* 2022 Jun 3 [cited 2024 Jul 24]; 13: 888710. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9204169/>
8. Chauhan M, Kimothi A, Sharma A, Pandey A. Cold adapted *Pseudomonas*: ecology to biotechnology. *Front Microbiol.* 2023 Jul 17 [cited 2024 Jul 24]; 14: 1218708. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1218708/full>
9. Deshmukh AJ, Jaiman RS, Bambharolia RP, et al. Seed biopriming—a review. *Int J Econ Plants.* 2020; 7(1): 38–43.
10. Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, Islam MT, editors. *Plant tolerance to environmental stress: Role of phytoprotectants.* Boca Raton: CRC Press. 2019. 468 p.
11. Jankovska-Bortkevič E, Katerova Z, Todorova D, et al. Effects of auxin-type plant growth regulators and cold stress on the endogenous polyamines in pea plants. *Horticulturae.* 2023 Feb 10 [cited 2024 Jul 24]; 9(2): 244. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-7524/9/2/244>
12. Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R. Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *J Plant Physiol.* 2018; 226: 123–35.
13. Keskin SO, Ali TM, Ahmed J, et al. Physico-chemical and functional properties of legume protein, starch, and dietary fiber — A review. *Legume Science.* 2022 Mar 16 [cited 2024 Jul 24]; 4(1): e117. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/leg3.117>
14. Kollmen J, Strieth D. The beneficial effects of cyanobacterial co-culture on plant growth. *Life (Basel).* 2022 Jan 31 [cited 2024 Jul 24]; 12(2): 223. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/2/223>
15. Koo YM, Heo AY, Choi HW. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *Plant Pathol J.* 2020; 36(1): 1–10.
16. Kumar M, Poonam Ahmad S, Singh RP. Plant growth promoting microbes: Diverse roles for sustainable and ecofriendly agriculture. *Energy Nexus.* 2022 Sep 1 [cited 2024 Jul 24]; 7: 100133. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772427122000882>
17. Kumar S, Jeevaraj T, Yunus MH, et al. The plant cytoskeleton takes center stage in abiotic stress responses and resilience. *Plant Cell Environ.* 2023; 46(1): 5–22.
18. Kushwaha P, Kashyap PL, Kuppusamy P. Microbes for cold stress resistance in plants: mechanism, opportunities, and challenges. In: Goel R, Soni R, Suyal D, editors. *Microbiological Advancements for Higher Altitude Agro-Ecosystems and Sustainability.* Rhizosphere Biology. Singapore: Springer; 2020. p. 269–92.
19. Lone AA, Khan MN, Gul A, et al. Common beans and abiotic stress challenges. *Curr J Appl Sci Technol.* 2021; 40(14): 41–53.
20. Ma H, Liu M. The microtubule cytoskeleton acts as a sensor for stress response signaling in plants. *Mol Biol Rep.* 2019; 46(5): 5603–8.
21. Mishra PK, Bisht SC, Ruwari P, et al. Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant *Pseudomonas* from NW Himalayas. *Arch Microbiol.* 2011; 193(7): 497–513.
22. Morcillo RJL, Manzanera M. The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. *Metabolites.* 2021 May 24 [cited 2024 Jul 24]; 11(6): 337. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/11/6/337>
23. Qian D, Xiang Y. Actin cytoskeleton as actor in upstream and downstream of calcium signaling in plant cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 20 [cited 2024 Jul 24]; 20(6): 1403. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/6/1403>
24. Rais A, Jabeen Z, Shair F, et al. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS One.* 2017 Nov 21 [cited

in plants treated with *Pseudomonas putida* suspension, both under immediate and delayed cold exposures.

The authors are thankful to Yurii H. Kot, PhD, Associate Professor of Biochemistry Department at V.N. Karazin Kharkiv National University for his assistance in research with confocal microscope.

References

1. Abo-Shady AM, Osman MEH, Gaafar RM, et al. Cyanobacteria as a valuable natural resource for improved agriculture, environment, and plant protection. *Water Air Soil Pollut.* 2023 May 4 [cited 2024 Jul 24]; 234(5): 313. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-023-06331-7>
2. Acuña-Rodríguez IS, Newsham KK, Gundel PE, et al. Functional roles of microbial symbionts in plant cold tolerance. *Ecol Lett.* 2020; 23(6): 1034–48.
3. Alvarez AL, Weyers SL, Goemann HM, Peyton BM, Gardner RD. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research.* 2021 Feb 9 [cited 2024 Jul 24]; 54: 102200. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926421000199>
4. Atramentova LO, Utevska OM. [Statistical methods in biology]. Kharkiv: V.N. Karazin Kharkiv National University; 2007. 288 p. Ukrainian.
5. Bhat KA, Mahajan R, Pakhtoon MM, et al. Low temperature stress tolerance: An insight into the omics approaches for legume crops. *Front Plant Sci.* 2022 Jun 3 [cited 2024 Jul 24]; 13: 888710. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9204169/>
6. Chauhan M, Kimothi A, Sharma A, et al. Cold adapted *Pseudomonas*: ecology to biotechnology. *Front Microbiol.* 2023 Jul 17 [cited 2024 Jul 24]; 14: 1218708. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1218708/full>
7. Deshmukh AJ, Jaiman RS, Bambharolia RP, et al. Seed biopriming—a review. *Int J Econ Plants.* 2020; 7(1): 38–43.
8. Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, Islam MT, editors. *Plant tolerance to environmental stress: Role of phytoprotectants.* Boca Raton: CRC Press. 2019. 468 p.
9. Jankovska-Bortkevič E, Katerova Z, Todorova D, et al. Effects of auxin-type plant growth regulators and cold stress on the endogenous polyamines in pea plants. *Horticulturae.* 2023 Feb 10 [cited 2024 Jul 24]; 9(2): 244. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-7524/9/2/244>
10. Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R. Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *J Plant Physiol.* 2018; 226: 123–35.
11. Keskin SO, Ali TM, Ahmed J, et al. Physico-chemical and functional properties of legume protein, starch, and dietary fiber—A review. *Legume Science.* 2022 Mar 16 [cited 2024 Jul 24]; 4(1): e117. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/leg3.117>
12. Kollmen J, Strieth D. The beneficial effects of cyanobacterial co-culture on plant growth. *Life (Basel).* 2022 Jan 31 [cited 2024 Jul 24]; 12(2): 223. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/2/223>
13. Kolupaev YuE, Yastreb TO, Shkliarevskiy MA, et al. [Salicylic acid: synthesis and stress-protective effects in plants].



- 2024 Jul 24]; 12(11): e0187412. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187412>
25. Rawat N, Singla-Pareek SL, Pareek A. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same. *Physiol Plant*. 2021; 171(4): 653–76.
 26. Saijo Y, Loo EP. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol*. 2020; 225(1): 87–104.
 27. Solomon W, Mutum L, Janda T, et al. Potential benefit of microalgae and their interaction with bacteria to sustainable crop production. *Plant Growth Regul*. 2023; 101: 53–65.
 28. Soualiou S, Duan F, Li X, Zhou W. Crop production under cold stress: An understanding of plant responses, acclimation processes, and management strategies. *Plant Physiol Biochem*. 2022; 190: 47–61.
 29. Sun D, Zhuo T, Hu X, et al. Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biological Control*. 2017; 114: 45–50.
 30. Takács G, Stirk WA, Gergely I, et al. Biostimulating effects of the cyanobacterium *Nostoc piscinale* on winter wheat in field experiments. *S Afr J Bot*. 2019; 126: 99–106.
 31. Zboralski A, Filion M. *Pseudomonas* spp. can help plants face climate change. *Front Microbiol*. 2023 Jun 23 [cited 2024 Jul 24]; 14: 1198131. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1198131/full>
 32. Zhang S. Recent advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules*. 2023 Feb 23 [cited 2024 Jul 24]; 28(5): 2158. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/5/2158>
- The bulletin of Kharkiv national agrarian university. Series biology. 2021; (2): 6–22. Ukrainian.
14. Koo YM, Heo AY, Choi HW. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *Plant Pathol J*. 2020; 36(1): 1–10.
 15. Kumar M, Poonam Ahmad S, Singh RP. Plant growth promoting microbes: Diverse roles for sustainable and ecofriendly agriculture. *Energy Nexus*. 2022 Sep 1 [cited 2024 Jul 24]; 7: 100133. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772427122000882>
 16. Kumar S, Jeevaraj T, Yunus MH, et al. The plant cytoskeleton takes center stage in abiotic stress responses and resilience. *Plant Cell Environ*. 2023; 46(1): 5–22.
 17. Kushwaha P, Kashyap PL, Kuppusamy P. Microbes for cold stress resistance in plants: mechanism, opportunities, and challenges. In: Goel R, Soni R, Suyal D, editors. *Microbiological Advancements for Higher Altitude Agro-Ecosystems and Sustainability*. Rhizosphere Biology. Singapore: Springer; 2020. p. 269–92.
 18. Lone AA, Khan MN, Gul A, et al. Common beans and abiotic stress challenges. *Curr J Appl Sci Technol*. 2021; 40(14): 41–53.
 19. Ma H, Liu M. The microtubule cytoskeleton acts as a sensor for stress response signaling in plants. *Mol Biol Rep*. 2019; 46(5): 5603–8.
 20. Mishra PK, Bisht SC, Ruwari P, et al. Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant *Pseudomonas* from NW Himalayas. *Arch Microbiol*. 2011; 193(7): 497–513.
 21. Morcillo RJL, Manzanera M. The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. *Metabolites*. 2021 May 24 [cited 2024 Jul 24]; 11(6): 337. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/11/6/337>
 22. Qian D, Xiang Y. Actin cytoskeleton as actor in upstream and downstream of calcium signaling in plant cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 20 [cited 2024 Jul 24]; 20(6): 1403. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/6/1403>
 23. Rais A, Jabeen Z, Shair F, et al. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS One*. 2017 Nov 21 [cited 2024 Jul 24]; 12(11): e0187412. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187412>
 24. Rawat N, Singla-Pareek SL, Pareek A. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same. *Physiol Plant*. 2021; 171(4): 653–76.
 25. Saijo Y, Loo EP. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol*. 2020; 225(1): 87–104.
 26. Shevchuk OA, Kravchuk GI, Vergelis VI, et al. [The effect of stimulant drugs on the morphometric indicators of seedlings and sowing qualities of bean seeds]. *Agriculture and forestry*. 2019; (12): 225–32. Ukrainian.
 27. Solomon W, Mutum L, Janda T, et al. Potential benefit of microalgae and their interaction with bacteria to sustainable crop production. *Plant Growth Regul*. 2023; 101: 53–65.
 28. Soualiou S, Duan F, Li X, et al. Crop production under cold stress: An understanding of plant responses, acclimation processes, and management strategies. *Plant Physiol Biochem*. 2022; 190: 47–61.
 29. Sun D, Zhuo T, Hu X, et al. Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biological Control*. 2017; 114: 45–50.
 30. Takács G, Stirk WA, Gergely I, et al. Biostimulating effects of the cyanobacterium *Nostoc piscinale* on winter wheat in field experiments. *S Afr J Bot*. 2019; 126: 99–106.
 31. Zboralski A, Filion M. *Pseudomonas* spp. can help plants face climate change. *Front Microbiol*. 2023 Jun 23 [cited 2024 Jul 24]; 14: 1198131. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1198131/full>
 32. Zhang S. Recent advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules*. 2023 Feb 25 [cited 2024 Jul 24]; 28(5): 2158. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/5/2158>

