



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Raminta Šmaižytė

NAMINĖS OBELS ŪGLIŲ IR ENDOFITINIŲ BAKTERIJŲ
SĄVEIKOS *IN VITRO* PROTEOMOS TYRIMAS

Magistro projektas

Vadovai

LAMMC dr. Danas Baniulis

KTU dr. Vilija Kriščiūnienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

NAMINĖS OBELIS ŪGLIŲ IR ENDOFITINIŲ BAKTERIJŲ
SĄVEIKOS *IN VITRO* PROTEOMOS TYRIMAS

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (kodas **621J70004**)

Vadovas

(parašas) Dr. Danas Baniulis

Dr. Vilija Kriščiūniene

(data)

Recenzentas

(parašas) Doc. Ilona Jonuškienė

(data)

Projektą atliko

(parašas) Raminta Šmaižytė

(data)

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

(Fakultetas)

Raminta Šmaižytė

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Naminės obels ūglių ir endofitinių bakterijų sąveikos *in vitro* proteomos tyrimas“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 _____ m. _____ d.
_____ Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Ramintos Šmaižytės**, baigiamasis projektas tema „Naminės obels ūglių ir endofitinių bakterijų sąveikos *in vitro* proteomos tyrimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

SANTRUMPOS	11
ĮVADAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Naminė obelis	13
1.1.1. Obels mikrodauginimas <i>in vitro</i>	14
1.1.2. Obels <i>in vitro</i> sąlygų sukeliamas stresas	15
1.2. Endofitinės bakterijos	15
1.2.1. Bakterinių endofitų tyrimai ir įvairovė.....	16
1.2.2. Augalų ir endofitinių bakterijų sąveika	17
1.2.3. Endofitinių bakterijų tyrimai <i>in vitro</i>	18
1.3. Omikos mokslas ir technologijos.....	19
1.3.1. Proteomika.....	21
1.3.2. Dvikryptė baltymų elektroforezė.....	22
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	25
2.1. Tyrimui naudotos medžiagos, maitinamųjų terpių ir tirpalų sudėtis	25
2.2. Tyrimo objektas	27
2.3. Naminės obels ūglių ir endofitinių bakterijų ruošimas	28
2.4. Obels ūglių inokuliacija endofitais ir auginimo sąlygos.....	28
2.5. Baltymų pavyzdžių iš obels ūglių ruošimo metodika.....	29
2.6. Dvikryptės baltymų elektroforezės metodas.....	30
2.6.1. Dvikryptės baltymų elektroforezės duomenų analizė	32
2.7. Baltymų identifikavimas masių spektrometrijos metodu	32
2.7.1. Gelio proteoformų skaidymas tripsinu	32
2.7.2. Baltymų identifikavimas	33
2.8. Bioinformatinė ir statistinė analizė	33
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	35
3.1. Endofitų įtakos vertinimas ūglių augimo savybėms ir morfologijai.....	35
3.2. Obels ląstelių visuminė baltymų analizė dvikryptės baltymų elektroforezės metodu.....	37
3.2.1. Principinė komponentų analizė.....	45
3.2.2. Bakterijų poveikis obels ūglių baltymų raiškai	46
3.2.3. Diferencinės raiškos baltymų funkcijos	51
4. REKOMENDACIJOS	55
IŠVADOS	59
LITERATŪROS SĄRAŠAS	60

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1.1. pav. Obels ūgliai skirtingais mikrodauginimo <i>in vitro</i> tarpsniais	14
1.2. pav. 2–D PAGE metodas	23
2.1. pav. Ūglių inokuliacija endofitais pagal Lery ir kt. 2010	29
2.2. pav. Absorbcijos ir baltymo mėginio koncentracijos standartinė kreivė	30
3.1. pav. Naminės obels ūglių masė (A) ir pridėtinių ūglių skaičius (B) po 21 dienos auginimo su endofitinėmis <i>Bacillus</i> spp. Oa_4 ir Da_1 bakterijomis, esant skirtingomis apšvietimo sąlygomis	36
3.2. pav. Diferencine raiška pasižyminčių 49 proteoformų duomenys keturių eksperimento grupių bandiniuose: kontrolės ir po poveikio su <i>Bacillus</i> spp. kamienais Oa_4 ir Da_1 esant skirtingom apšvietimo sąlygom	42
3.3. pav. Endofitų panašumų ir skirtumų analizės rezultatai	45
3.4. pav. Diferencine raiška pasižyminčių obels ląstelių proteoformų kiekio hierarchinės klasterių analizės rezultatai	49
3.5. pav. 1, 2, 3 ir 6–os genų raiškos grupėms identifikuotų biologinių procesų genų ontologijos terminų sąsajos semantinėje erdvėje ($\log_{10}p$ reikšmė) apibendrintos taikant REVIGO algoritmą	52
3.6. pav. 1, 2, 3 ir 6–os genų raiškos grupių baltymams analogiškų <i>A. thaliana</i> genų sąsajų analizės rezultatai	53
4.1. pav. Rekomenduojama endofitų taikymo augalo reguliacijai pramoninio augalų dauginimo <i>in vitro</i> proceso schema.....	56
4.2. pav. Rekomenduojama baltymų gryninimo gamybos aparatūrinė schema.....	58

LENTELIŲ SĄRAŠAS

2.1. lentelė. Mėginių ir dažų paskirstymas IPG juostelėse, ruošiant dvikryptei elektroforezei	31
3.1. lentelė. Proteomos tyrimu identifikuoti diferencinės raiškos baltymai.....	39
4.1. lentelė. Baltymų gryninimo gamybos principinės aparatūrinės schemos įrenginių žymėjimas	57

Šmaižytė, Raminta. Naminės obels ūglių ir endofitinių bakterijų sąveikos *in vitro* proteomos tyrimas. Magistro baigiamasis projektas / LAMMC vadovas dr. Danas Baniulis ir KTU vadovė dr. Vilija Kriščiūnienė; Kauno technologijos universitetas, cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis : Technologijų mokslai, biotechnologijos sritis.

Reikšminiai žodžiai: *Naminė obelis; endofitai; mikrodauginimas; in vitro; proteomika;*
Kaunas, 2018. 67 p.

SANTRAUKA

Naminė obelis (*Malus × domestica* Borkh.) yra viena iš modelinių rūšių, tinkama tiksliniams genomo, atsparumo ligoms bei dauginimo ir transformacijos tyrimams *in vitro*. Žinoma, kad endofitai turi teigiamą poveikį augalų augimui ir gali padėti apsisaugoti nuo biotinio ir abiotinio streso, tačiau *in vitro* sąlygomis endofitų poveikis augalams gali tapti patogenišku ir sukelti augalui stresą ir žūtį. Priežastys, sukeliančios neigiamą poveikį augalams *in vitro*, mažai tirtos ir vis dar sunkiai suprantamos.

Siekiant įvertinti endofitinių bakterijų poveikį 'Gala' naminės obels ūglių augimui *in vitro*, ūgliai buvo inokuliuoti dviem *Bacillus spp.* bakterijų kamienais Oa_4 ir Da_1 ir auginti kontroliuojamose sąlygose, esant skirtingam apšvietimui. Įvertinus obels ūglių masę ir pridėtinių ūglių skaičių po 21 dienos inkubacijos su bakteriniais endofitais, buvo nustatyta, kad visais atvejais endofitai slopino ūglių augimą *in vitro* sąlygomis. Siekiant įvertinti naminės obels baltymų raiškos pokyčius po inokuliacijos endofitais, buvo atlikta visuminė proteomos analizė. Nustatyta 111-os proteoformų patikimi raiškos skirtumai, iš kurių 49 buvo identifikuotos. Inkubacija su endofitais didino raišką baltymų dalyvaujančių oksidacijos–redukcijos, apsauginio atsako, baltymų metabolizmo bei jų funkcijos reguliacijos, ląstelės organizacijos ir lipidų metabolizmo procesuose. Didžiausi baltymų raiškos pokyčiai užfiksuoti PLAT domena turinčiam baltymui 1 (PLAT1), kuris dalyvauja ląstelių migracijos ir audinių reorganizacijos procesuose ir žemos temperatūros aktyvuotam baltymui (RD21A), kuris atsakingas už atsaką į stresą ir patogenus.

Išvados:

1. Įvertinus endofitinių *Bacillus spp.* kamienų Oa_4 ir Da_1 poveikį naminės obels ūgliams *in vitro* sąlygomis, nustatyta, kad nepriklausomai nuo apšvietimo sąlygų abu kamienai panašiai slopina ūglių augimą (nuo 3,4 iki 4,4 kartų) ir pridėtinių ūglių formavimąsi (nuo 2,7 iki 3,6 kartų). Po inkubacijos su endofitinėmis

bakterijomis ūgliams morfologinių pažeidimų nenustatyta, todėl ūglių augimo slopinimas nėra patogenezės pasekmė.

2. Obels ūglių proteomos tyrimu nustatyta, kad inkubacija su endofitiniais *Bacillus* spp. kamienais Oa_4 ir Da_1 daugiausiai lemia baltymų kiekio didėjimą (109 iš 111 patikimų skirtumų) ir didesnis poveikis baltymų raiškai nustatytas sumažinto apšvietimo sąlygomis. Didesnį poveikį ūglių baltymų raiškai turėjo inkubacija su *Bacillus* sp. kamieniu Oa_4.
3. Įvertintus ląstelės biologinius procesus ir genų funkcijas susijusias su endofitinių bakterijų poveikiu naminės obels ūgliams *in vitro* nustatyta, kad inkubacija su *Bacillus* spp. bakterijų kamienais Oa_4 ir Da_1 lemia oksidacijos–redukcijos, apsauginio atsako, baltymų metabolizmo bei jų funkcijos reguliacijos, ląstelės organizacijos ir lipidų metabolizmo procesų pokyčius obels ūglių ląstelėse.

Šmaižytė, Raminta. *Proteomics Analysis of Interaction of Domestic Apple Shoots and Endophytic Bacteria In Vitro*. Master's thesis in Industrial Biotechnology / LAMMC supervisor dr. Danas Baniulis and KTU supervisor dr. Vilija Kriščiūnienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Technology Science, Biotechnology.

Keywords: *domestic apple; endophytes; micropropagation; in vitro; proteomics;*
Kaunas, 2018. 67 pages.

SUMMARY

Domestic apple (*Malus × domestica* Borkh) is one of the model species suitable for targeted genome analysis, resistance to diseases and reproduction and transformation studies *in vitro*. It is known that endophytes have a positive effect on plant growth and can help protect against biotic and abiotic stresses. However, *in vitro* conditions to endophyte effects on plants can become pathogenic and induce plant stress and death. Causes of the adverse effects on plants *in vitro* are poorly understood.

In order to evaluate the effect of endophytic bacteria on the growth of „Gala“ domestic apple shoot *in vitro*, the shoots were inoculated with two *Bacillus* spp. bacterial strains Oa_4 and Da_1 and grown under controlled conditions using two different lighting conditions. Analysis of shoot weight and number of auxiliary shoots after 21 days of inoculation with bacterial endophytes revealed that endophytes in all experimental groups inhibited the growth of shoots *in vitro*. In order to evaluate the changes in the domestic apple protein expression after inoculation with endophytes, a proteomic analysis was performed. Differential expression of 111 proteforms were established, of which 49 were identified. Incubation with endophytes upregulated expression of the proteins involved in oxidation–reduction, defence response, protein metabolism and regulation of their function, cellular organization, and lipid metabolic processes. The largest changes in protein expression were detected for PLAT domain protein 1 (PLAT1), which is related to cell migration and tissue reorganization processes, and low temperature activated protein (RD21A), which is involved in response to stress and pathogens.

Conclusions:

1. After evaluation of endophytic *Bacillus* spp. strain Oa_4 and Da_1 effects on domestic apple shoot *in vitro* condition, we established that both strains had similar inhibiting effect on the growth of shoots (from 3,4 to 4,4 times) and the formation of auxiliary shoots (from 2,7 to 3,6 times), irrespective of the lighting conditions. After incubation with endophytic bacteria, no morphological lesions

were detectable, therefore the inhibition of shoot growth is not a consequence of pathogenesis.

2. Proteomic analysis revealed that the incubation of apple shoot with the endophytic *Bacillus* spp. strains Oa_4 and Da_1 had mainly protein expression upregulating effect (109 out of 111 significant differences) and a larger effect on protein expression was observed under reduced light conditions. Incubation with *Bacillus* sp. strain Oa_4 had a larger effect on shoots protein expression.
3. Evaluation cell biological processes and gene functions related to the effects of endophytic bacteria on domestic apple shoots *in vitro* showed that incubation with *Bacillus* spp. bacterial strain Oa_4 and Da_1 lead to changes in oxidation–reduction, defence response, protein metabolism and their function regulation, cellular organization and lipid metabolic processes of the apple shoots cells.

SANTRUMPOS

2-D – dviejų dimensijų

2-D PAGE – dviejų dimensijų poliakrilamido gelio elektroforezė

ACN – acetronitrilas

ADJ – aktyvūs deguonies junginiai

BME – 2-merkaptoetanolis

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonatas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DTT – ditioneitolas

GO – genų ontologija

IEF – izoelektrinis fokusavimas

IPG – imobilizuotas pH gradientas

MM – molekulinė masė

MS – masių spektrometrija

pI – izoelektrinis taškas

PLAT1 – PLAT domeną turintis baltymas 1

RD21A – žemos temperatūros aktyvuotas baltymas

SDS – dodecilsulfatas

IVADAS

Naminė obelis (*Malus x domestica* Borkh.) yra ekonomiškai svarbus vaismedis, plačiai paplitęs vidutinio klimato regionuose. Ji priklauso erškėtinių (*Rosaceae*) augalų šeimai ir yra viena iš šios šeimos augalų modelių [1]. Naminė obelis turi unikalių savybių, dėl to ji puikiai tinka įvairiems tyrimams *in vitro*.

Siekiant išauginti tinkamą dauginamą medžiagą ir išlaikyti dauginamo augalo genetinę informaciją ir biologinę įvairovę taikomas augalų mikrodauginimas. Mikrodauginimas – greitas pasirinkto augalo dauginimas naudojant *in vitro* kultūros metodus [2], tačiau toks dauginimo būdas augalui gali sukelti stresą, kuris slopina augalo augimą bei didina somakloninį kintamumą.

Augalus kolonizuoja daugybė mikroorganizmų, kurių didelę dalį sudaro bakteriniai endofitai, apimantys įvairias rūšis ir gentis. Endofitai – mikroorganizmai, kurie gyvena ar egzistuoja gyvų augalų audiniuose [3]. Jų gausu augalo stiebuose ir lapų audiniuose. Endofitai turi poveikį augalų sveikatai bei augimui. Jie gali veikti kaip silpni patogenai [4], tačiau dažniausiai jie turi teigiamą poveikį augalui: endofitai didina augalo atsparumą stresui patogenams ir žaladariams [5], taip pat padeda augalui įsisavinti maistines medžiagas, skatina augimą [6].

Endofitiniai mikroorganizmai gali būti naudingi siekiant sumažinti *in vitro* sąlygų sukeltą stresą mikrodauginimo metu. Nors nustatytas teigiamas endofitų poveikis augalams, tačiau *in vitro* sąlygomis dalis endofitinių bakterijų tampa patogeniškomis. Priežastys, kurios lemia augalų ir endofitų sąveikos pasikeitimus iš mutualistinės į patogeninę mažai tirtos ir nepakankamai suprastos.

Tyrimo tikslas – nustatyti *Bacillus sp.* bakterijų kamienų poveikį naminės obels ūglių augimui *in vitro* ir proteomos baltymų raiškai.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti endofitinių *Bacillus spp.* kamienų Oa_4 ir Da_1 poveikį naminės obels ūglių augimui ir ūglių formavimui *in vitro*.
2. Visuminės analizės metodu įvertinti naminės obels ūglių baltymų raiškos pasikeitimus po inkubacijos su *Bacillus spp.* kamienais Oa_4 ir Da_1.
3. Įvertinti ląstelės biologinius procesus ir genų funkcijas susijusias su endofitinių bakterijų poveikiu naminės obels ūgliams *in vitro*.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Naminė obelis

Erškėtinių (*Rosaceae*) augalų šeima, apima vieną trečdalį visų žydinčių augalų [6] ir yra viena iš ekonomiškai svarbių augalų šeimų vidutinėje klimato juostoje [7]. *Rosaceae* šeima sudaryta iš daugiau kaip 100 genčių ir 3 000 rūšių [8]. Daugiausiai pasaulyje auginama erškėtinių šeimos augalų vaisių (obuolių, persikų, braškių, aviečių, kriaušių, migdolų, slyvų ir vyšnių), priklausančių *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Fragaria* ir *Rubus* gentims. Šiuo metu labiausiai išsivysčiusios *Rosaceae* modelio rūšys yra naminė obelis (*Malus × domestica*), persikas (*Prunus persica*) ir diploidinė paprastoji žemuogė (*Fragaria vesca*). Kiekvienas iš trijų nurodytų modelių yra tolimas *Rosaceae* šeimos subtaksonas, ir kiekvienas turi unikalių savybių, todėl jis puikiai tinka tiksliniams genomo tyrimams [1].

Naminė obelis (*Malus × domestica* Borkh), tai nedidelis lapuotis, auginamas vidutinio klimato regione [9] ir visame pasaulyje gerai žinomas dėl skanių ir maistingų vaisių [10]. Obels lapai yra tarp 5–12 cm ilgio ir 3–6 cm pločio. Ji žydi pavasarį ir turi baltos spalvos žiedus su rausvu atspalviu [11]. Kaip maisto šaltinis, naminės obels vaisiai naudojami jau daugelį metų, todėl yra sukurta daug savo požymiais skirtingų obels veislių. Tačiau visos obelų veislės, naudojamos vaisiniai sodininkystei, vadinamos tiesiog naminėmis obelėmis, o jų šiuo metu pasaulyje priskaičiuojama apie 7 500 [12].

Naminė obelis priklauso erškėtinių (*Rosaceae*) augalų šeimai, obelinių (*Maloideae*) pošeimiui ir obelų (*Malus*) genčiai [11]. *Malus* gentį sudaro 27 laukinės rūšys iš kurių maždaug septynios rūšys yra taksonomiškai arti *Malus × domestica* [13]. Genetiniai tyrimai parodė, kad naminės obelys yra artimiausios *Malus sieversii* ir *Malus sylvestris* [14], kurios kaip manoma yra kilusios iš Centrinės Azijos ir iš ten paplito po pasaulį [15]. Dauguma obels veislių yra diploidai ($2n = 34$), ir jo genomą sudaro 1,54 pg deoksiribonukleorūgštis (DNR) vienam 2C branduoliui arba 750 Mb haploidiniam genomui [1; 16]. Taigi obels genomo dydis yra panašus į sorgų (~730 Mb) [17] ir pomodoro (~950 Mb) genomo dydį [18].

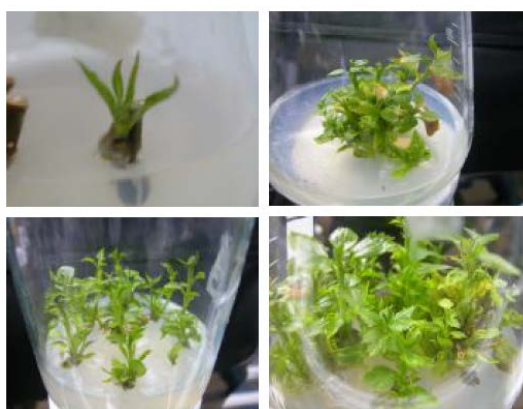
Obelys yra neatsparios ligoms, kurias gali sukelti grybai, bakterijos, virusai bei vabzdžiai. Obelų auginimas labai priklauso nuo klimato sąlygų [12]. Įvairios obels rūšys tarpusavyje gali būti dauginamos bei skiepijamos ir taip sukuriama naujų, naudingų savybių turinčių obelų. Akiavimas arba skiepijimas yra tradiciniai vegetatyviniai obels dauginimo metodai, tačiau jie priklauso nuo sezono ir negali užkirsti kelio ligoms ir užtikrinti derliaus kokybės [19]. Obels mikrodauginimas atveria naujas vaismedžių dauginimo galimybes, leidžiančias išspręsti

problemas, susidarančias augalus dauginant įprastiniais metodais [20]. Mikrodauginimas leidžia greitą naujų veislių ir selekcinų linijų kūrimą bei sveikos augalų dauginamosios medžiagos palaikymą [19; 21].

1.1.1. Obels mikrodauginimas *in vitro*

Augalų mikrodauginimas yra apibūdinamas kaip vegetatyvinis įvairių augalo somatinių ląstelių ar audinių kultūrų dauginimas kontroliuojamomis sąlygomis uždaroje sistemoje (*in vitro*), siekiant per trumpą laiką (lyginant su tradiciniu dauginimu) sukurti didelį kiekį augalų, genetiškai identiškų pradiniam augalui [22; 23]. Esant tinkamoms *in vitro* sąlygoms skirtingos augalų dalys (pumpurai, meristemos, audiniai ir ląstelės), gali regeneruoti į naują augalą ir gali būti naudojami dauginimui [22].

Obelių mikrodauginimas *in vitro* suteikia galimybę biotechnologijos tyrimams padauginti ir regeneruoti augalus steriliomis sąlygomis [24]. Morfogeniniai būdai, per kuriuos ląstelės regeneruojasi į augalus yra organogenezė (ūglių susidarymas, po kurių eina iššaknijimas arba tam tikrų dominančių organų susidarymas) ir embriogenezė (somatinių embrionų susidarymas ir jų dauginimas į naujus augalus) ir abu gali diferencijuoti iš kauluso [23]. Sėkmingas obelių mikrodauginimas priklauso nuo kelių vidaus ir išorės veiksnių, įskaitant genotipą, fiziologinę mėginių paėmimo būklę, *in vitro* terpės sudedamąsias dalis ir jų santykį, šviesą, temperatūrą bei kitus veiksnius [25]. Praktikoje visi mikrodauginimo protokolai yra nustatomi empiriškai kiekvienu konkrečiu atveju, nustatant kiekvieno morfogenezės etapo vidutines sudedamąsias dalis (pvz.: augalų augimo reguliatorius, maistines medžiagas) ir aplinkos sąlygas (pvz.: šviesa, temperatūra). Paprastai šias kultūras palaiko pusiau kietas substratas, kuris susideda iš terpės ir standinančio komponento [23].



1.1. pav. Obels ūgliai skirtingais mikrodauginimo *in vitro* tarpsniais [23]

Pagrindiniai obelių mikrodauginimo privalumai yra: a) didelis našumas dauginti tikslią augalo medžiagą, palyginti su tradiciniais klonavimo metodais; b) gebėjimas gaminti palikuonis

ištisus metus; c) gaminti augalus, nepažeistus ligų; d) galimybė dauginti genotipus, kurie gamina sterilias sėklas [22]. Mikrodauginimo privalumai, palyginti su įprastais dauginimo metodais, buvo priimti prieš dešimtmetį ir dabar šį dauginimo būdą dažnai naudoja daugelis mokslinių tyrimų laboratorijų, komercinės žemės ūkio, sodininkystės, miškininkystės ir kitos įmonės [23].

1.1.2. Obels *in vitro* sąlygų sukeliamas stresas

Augalų mikrodauginimo *in vitro* metodai sparčiai tobulėjo ir per pastaruosius keturis dešimtmečius buvo pritaikyti augalų biologijos, transformacijos tyrimuose, genofondo saugojimo ir pramoninio masto gamybos procesuose. Nustatyta, kad šie mikrodauginimo metodai tinka ne visoms augalų, įskaitant ir obelų rūšims, veislėms ar genotipams, todėl didžiąją dalį augalų sudėtinga dauginti *in vitro* [26; 27]. Dauguma tyrimų, skirtų spręsti *in vitro* augalų mikrodauginimo problemas daugiausia dėmesio skiria metodo optimizavimui, susijusiam su augalų augimo reguliatorių sudėtimi ir augimo terpėmis [22]. Keletoje tyrimuose nagrinėjama terpių mineralinių medžiagų sudėtis ir siekiama optimizuoti bazinių druskų ir mikroelementų kieki [28; 29]. Tačiau, neretai augalų nesugebėjimas augti *in vitro* sąlygomis ar prastas jų išgyvenimas yra susijęs su *in vitro* sąlygų sukeliamu oksidaciniu stresu [30].

In vitro aplinka, tokia kaip maistinės medžiagos, mitybinės terpės augimo reguliatoriai, prastas apšvietimas, žema CO₂ koncentracija šviesos periodo metu ir didelė drėgmė sukelia nepalankias sąlygas, lemiančias augalo fiziologinių procesų pusiausvyros disbalansą ir *in vitro* oksidacinio streso indukciją [31; 32]. Pagrindinis *in vitro* aplinkos streso augalui požymis – aktyvių deguonies junginių (ADJ) kaupimas ląstelėje. ADJ sukelia ląstelės komponentų pažeidimus, įskaitant lipidų peroksidaciją, membranos pažeidimą. Metabolinių ir vystymosi procesų pokyčiai paspartina laisvųjų radikalų sintezę, kadangi sukelia antioksidacinių fermentų aktyvumo ir antioksidantų koncentracijos pokyčius arba ADJ sintezę chloroplastuose, mitochondrijose, peroksisomose, plazminėje membranoje ir taip pat citozolyje. Visi šie pokyčiai lemia sulėtėjusį augalo augimą, pagreitina audinių senėjimo procesus ir fiziologinį atsaką, kuris slopina augalo audinių regeneraciją [33]. Dėl vandens pertekliaus augalų audiniuose stebimas augalų aeracijos stresas, kuris pasireiškia kaip oksidacinis stresas [34; 35].

1.2. Endofitinės bakterijos

Endofitinės bakterijos yra endosimbiozinių mikroorganizmų grupė, plačiai paplitusi tarp augalų, kolonizuojanti tarpląstelines bei viduląstelines sritis ir nesukelianti augalų ligų ar reikšmingų morfologinių pokyčių [36]. Skirtingai nuo fitopatogenų, tokios bakterijos paprastai nesudaro jokių esminių ligos simptomų, o endofitų atsiradimas nėra susijęs su augalų audinių morfologiniais pokyčiais, pavyzdžiui, sukeltais šaknų gumbelinių bakterijų simbiotų [37].

Dauguma literatūros dokumentuoja skirtingą endofitinių bakterijų poveikį augalų sveikatai ir augimui. Endofitai padeda lengviau įsisavinti ir gauti maistinių medžiagų, stiprina streso toleravimą ir atsparumą ligoms [38; 39]. Endofitų gebėjimas skatinti augalo augimą gali būti tiesiogiai susijęs su gebėjimu gaminant augalų augimo hormonus, taip pat dėl sąveikos, kuri pakeičia endogeninę augalų hormonų gamybą arba veiklą, kuri didina maistinių medžiagų, tokių kaip azotas ir fosforas, prieinamumą [40]. Pasipriešinimo augalų ligoms savybės yra susijusios su endofitinių bakterijų gebėjimu gaminti įvairius junginius, tokius kaip antibiotikai arba chitinazės fermentai, kurie gali slopinti augalų patogenų augimą ir tokiu būdu veikti kaip biokontrolės medžiagos [41; 42; 43; 44]. Taip pat buvo įrodyta, kad endofitai stimuliuoja latentinį apsauginį mechanizmą, vadinamą indukuotu sisteminiu pasipriešinimu (ang. induced systemic resistance (ISR)), kuris užtikrina didesnę apsaugą nuo daugybės įvairių patogenų [45].

Dėl augalų augimo skatinimo ir ligų kontrolės savybių endofitus galima naudoti bioinokulantams žemės ūkyje augalų augimui skatinti ir pagerinti produkcijos kokybę.

1.2.1. Bakterinių endofitų tyrimai ir įvairovė

1997 m. Hallmanas kartu su kolegomis sudarė ištirtų endofitinių bakterijų sąrašą, kuris yra nuolat papildomas, kadangi įvairūs tyrimai, kurių metu randamos naujos endofitų rūšys, atliekami iki šiol [46]. Endofitų populiacijos įvairovė yra pakankamai didelė ir daugiausiai priklauso nuo bakterijų rūšies, šeimininkų genotipo bei aplinkos sąlygų [47; 48].

Įvairios endofitinės bakterijos atlieka neatsiejamą vaidmenį ekosistemose ir augalų fiziologijoje. Pradiniai endofitinių bakterijų įvairovės tyrimai daugiausia buvo pagrįsti endofitinių izoliatų, gautų iš augalų po paviršiaus dezinfekavimo, apibūdinimo [37]. Lodewyckx su bendraautoriais charakterizavo pagrindinius bakterijų izoliavimo metodus ir 81 bakterijų rūšį, kurios sudaro endofitines asociacijas su augalais [49].

Ankstyvieji endofitinių bendruomenių sudėties tyrimai atskleidė, kad skirtingi augalų šeimininkai jungia panašią bakterinių endofitų bendruomenę [50]. *Bacillus* ir *Pseudomonas* gentys įvardijamos kaip dažnai pasitaikančios žemės ūkio kultūrose [51; 52]. Endofitinės bakterijos dažniausiai priklauso α -, β - ir γ -proteobakterijų pogrupiams ir yra glaudžiai susijusios su epifitinėmis bakterijomis [47]. Įdomu tai, kad γ -proteobakterijų grupė yra labiausiai dominuojanti ir įvairi. Buvo pranešta, kad dauguma gramneigiamų endofitų veikia kaip biologinės kontrolės veiksniai [53], o tarp gramteigiamų bakterijų yra dominuojančios endofitinės rūšys, visų pirma tos, kurios priklauso *Bacillus* rūšims [54; 55].

Skirtinguose augaluose ir audiniuose endofitinių bakterijų populiacijų tankis yra labai skirtingas. Jis skiriasi nuo šimtų iki 9×10^9 bakterijų vienam gramui augalų audinio [56; 57; 58]. Paprastai endofitų populiacijų tankis yra didesnis augalų šaknyse ir kituose žemėje esančiuose audiniuose, palyginti su antžeminiais audiniais [58].

1.2.2. Augalų ir endofitinių bakterijų sąveika

Augalų ir endofitinių bakterijų sąveikai būdinga didelė taksonominė bakterijų ir augalų įvairovė. Augalai gyvena intymioje sąsajoje su mikroorganizmais, kurie atlieka svarbias funkcijas žemės ūkio ekosistemose. Bakterijos gali egzistuoti kaip laisvas gyvas organizmas grunte arba prie šaknų ar filozferos paviršiaus ir gali sukurti simbiozinius, mutualistinius, komensalistinius ir trofobiotinius ryšius su augalais [38; 59]. Nors endofitinės bakterijos yra prisitaikiusios gyventi konkrečių augalų genotipų viduje, įvairūs pranešimai rodo, kad endofitinių bakterijų bendrųjų strukturai įtakos turi ne tik augalo genotipas, bet ir abiotiniai bei biotiniai veiksniai, tokie kaip aplinkos sąlygos, mikrobus tarpusavio sąveika bei mikrobus sąveika su augalais [38].

Endofitinės bakterijos gyvena konkrečiuose augalo audiniuose (pvz.: šaknies žievėje arba ksilemoje) ir glaudžiai susijungia su augalu, keičiantis maistinėmis medžiagomis, fermentais (lipaze, katalaze, oksidaze ir t.t.), funkciniais agentais (sideroforais, biosurfaktantais ir t.t.) taip pat „signalais“. Endofitai kolonizuoja savo augalo šeimininko audinius, kuriuose jie išlieka, nepadarant neigiamų patogeninių padarinių (kvėpavimo, fotosintezės, maistinių medžiagų transporto sutrikimai, genų raiškos reguliacijos pokyčiai ir kt.). Priešingai šių endofitinių bakterijų buvimas augaluose šeimininkuose daro teigiamą poveikį jo augimui [60].

Endofitinės bakterijos gali reguliuoti metabolizmą, fitohormonų signalinius kelius ir tokiu būdu didinti augalų atsparumą aplinkos abiotiniam ar biotiniam stresui [37]. Endofitai taip pat gali reguliuoti augalo įvairių natūralių produktų, kuriuos būtų galima panaudoti medicinoje, žemės ūkyje ar pramonėje, gamybą [38]. Naudinga augalų ir mikrobus sąveika, kuri yra naudinga augalų sveikatai bei vystymuisi buvo plačiai aprašyta [61; 62; 63; 64].

Buvo ištirtos tiek patogeniškos, tiek naudingos sąveikos, atskleidus sudėtingus pripažinimo ir signalizavimo mechanizmus. Pavyzdžiui, simbioziniai organizmai sąveikauja su augalais ir suteikia jiems medžiagų apykaitos privalumų [65; 66; 67]. Geriausiai ištirtas bakterijų ir augalų simbiozės pavyzdys yra *Rhizobium* spp. – ankštinių sąveika [68]. Augalas jaučia *Rhizobium* ląsteles, o įvairios šeimininkų signalizacijos kaskados sukelia specifinių augalų ląstelių paplitimą aplink bakterijos infekcijos vietą. Šios simbiozinės bakterijos turi įtaką augalų augimui [67; 68].

1.2.3. Endofitinių bakterijų tyrimai *in vitro*

Nors endofitinės bakterijos egzistuoja daugelyje augalų rūšių ir yra izoliuotos iš įvairių augalų [49], buvo manoma, kad *in vitro* dauginamuose augaluose nėra jokių mikroorganizmų [69]. Be to, bakterijų buvimas mikrodauginamuose augaluose buvo laikomas kaip mikrobinis užteršimas, kurį būtina užkirsti ir pašalinti [70]. Tačiau naudinga endofitinių bakterijų ir mikrodauginamų augalų asociacija gali būti didelė, ir turėti teigiamą poveikį mikrodauginimui ir ląstelių kultūros tyrimams [69; 71].

Lauko kultūrose endofitai gali padėti augalų vystymuisi skatinant fosfatų solubilizacijos aktyvumą, indolo ir acto rūgščių gamybą, osmosinį reguliavimą, mineralų įsisavinimą ir azoto kaupimąsi bei metabolizmo pokyčius [38]. Nors šių bakterijų potencialas yra labai didelis siekiant pagerinti mikrodauginimą ir mikrodauginamų augalų aklimatizaciją, tačiau tokių endofitinių bakterijų yra nedaug [72]. Diasas su benrautoriais parodė, kad šios bakterijos gali paskatinti braškių augimą aklimatizacijos procese [71].

Monita su benrautoriais atliko tyrimą su ananasų augalų kultūra [72]. Buvo pastebėta, kad *in vitro* auginamų ananasų augalų kultūrose, be mikrobu inokuliavimo, buvo rasta endofitinių bakterijų augalo šaknyse bei lapuose, tiek jaunuose tiek subrendusiuose augaluose [72]. Kalbant apie ananasus, tai yra svarbi atogrąžų augalų kultūra, iš kurios augalų buvo izoliuotos ir apibūdintos diazotrofinės bakterijos. Bakterijos, susijusios su *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum lipoferum*, *Burkholderia sp.* gali būti aptiktos skirtingų genotipų šaknyse, stiebuose, lapuose ir vaisiuose [73]. Be to, tyrimai parodė teigiamą agronominį poveikį dėl diazotrofinių bakterijų inokuliavimo *in vitro* dauginimuose [74].

Barkas su benrautorais tyrė augalų augimą skatinančią rizobakteriją *Pseudomonas sp.* (padermė PsJN) siekiant paskatinti vynuogių (*Vitis vinifera L.*) transplantų pasipriešinimą pilkojo pelėsio augimui ir padidėjusiam plitimui ant augalo, kurį sukelia *Botrytis cinerea*. Vynuogių augalų inokuliavimas *in vitro* sukėlė reikšmingą augalų augimo skatinimą, kuris padarė juos atsparesnius, palyginti su neinokuliuotais augalais. Išaugintą kartu su *B. cinerea*, pilkojo pelėsio priežastiniu sukėlėju, tarp inokuliuotų ir neinokuliuotų augalų pastebimi reikšmingi ligos požymių intensyvumo skirtumai. Bakterijų buvimas vynuogių augaluose užtikrino augalų pasipriešinimą patogenui [75].

In vitro sąlygomis dalis endofitinių bakterijų gali tapti patogeniškomis. Inokuliacijos poveikis gali priklausyti nuo bakterijų padermės, augalo veislės ir inokuliuojamos kultūros amžiaus [4]. Longas su bendrautoriais tyrė bakterijų įtaką augalų audinių kultūroms. Ligomis pasižyminčios dviejų bulvių veislės kultūros buvo netiesiogiai inokuliuotos su dviem

bakterijom, kurios buvo izoliuotos iš daugkartinės subkultūrintos bulvių kultūros. Nei vienas iš organizmų prieš tai nebuvo žinomas kaip patogenas. Visos aiškiai užterštos kultūros, buvo šalinamos viso tyrimo eigos metu. Po vienerių metų ir vėliau, inokuliuotos kultūros parodė, kad sutriko lapų vystymasis, atsirado viršūnės nekrozė ir suplonėjo stiebų skersmuo, palyginti su neinokuliuotais augalais. Tokios priežastys leido tyrėjams padaryti išvadą, kad inokuliacija bakterijomis gali turėti ir žalingą poveikį audinių kultūroms [76].

1.3. Omikos mokslas ir technologijos

Biologijos moksle priesaga „-omika“ vartojama kalbant apie didelių biologinių molekulių rinkinių tyrimą [77]. Idėja, kad molekulinės biologijos sritis, reikalinga pereiti nuo izoliuotų biologinių molekulių tyrimų į plačią didelių biologinių molekulių komplekso analizę, buvo pabrėžta 2001 m. pabaigus žmogaus genomo projektą (angl. human genome project, HGP) [78; 79]. HGP parodė, kad santykinai ribotas genų skaičius gali būti nustatytas žmogaus genome, ir tai patvirtino teoriją, kad kompleksiniai biologiniai procesai gali būti reguliuojami ir kitais lygmenimis, ne tik per DNR sekas. Šis patvirtinimas paskatino spartų kelių molekulinės biologijos sričių vystymąsi, kurias kartu apibūdina terminas ‘omikos’. Šio termino sritis svyruoja nuo genomikos (orientuotas į genomą), proteomikos (daugiausia dėmesio skiriama dideliems baltymų kompleksams, proteomoms) iki metabolomikos (sutelktas į didelius mažų molekulių rinkinius, metabolomą) [80].

Genomika – mokslas, kuris nagrinėja genomo struktūrą ir organizavimą [81]. Ji apibrėžiama kaip viso genomo sekos ir joje esančios informacijos tyrimas, kuris yra labiausiai žinomas iš įvairių omikos sričių. Nuo 1995 m. beveik 300 genomo sekų nustatymas, su reprezentacinėmis rūšimis iš kiekvienos iš trijų gyvenimo karalysčių, buvo baigtas ir dar šimtai yra tiriama. Neapdorotos sekos duomenys palengvina daugybę įdomių palyginamųjų genomikos tyrimų, skirtų nustatyti genų reguliavimo elementus, suprasti išskyrimą ir tobulinti idėją apie evoliucinį gyvenimo medį [82].

Genomika ir proteomika papildo viena kitą. Genomika turi esminius apribojimus tiek, kiek genų sekos duomenyse yra nepakankamos informacijos, kad suprastų genų produktų funkciją. Nei DNR, nei mRNR nekoduoja signalo perdavimo ar metabolinės kaskados tvarkos. Koreliacijos trūkumas tarp genų ekspresijos ir baltymų funkcijos gali būti apibūdintas keliais požymiais: ląstelių lokusas ir genų ekspresijos laiko momentas gali skirtis nuo faktinio baltymų produkto, o baltymo rodoma veikla, parodo nežinomą geną [83].

Transkriptomikos srityje pateikiama informacija apie RNR transkripcijos buvimą ir santykinį jų gausumą, taip nurodant aktyvius ląstelės komponentus. Nuo 1990–ųjų vidurio

iki pabaigos, daugybė genomikos tyrimų ištyrė genų ekspresijos dinamiką daugelyje modelių sistemų ir aplinkoje. Mikro masyvai (angl. microarrays) ir serijinė genų išraiškos analizė (angl. serial analysis of gene expression (SAGE)) yra labiausiai naudojami metodai, kurie buvo taikomi daugeliui modelių sistemų, taip pat genų, kurie daugiausia yra išreikšti kamieninių ląstelių tyrime, tyrimas, siekiant klasifikuoti žmogaus vėžio molekulinis potipius ir kontroliuoti priimančios ląstelės transkripcijos atsaką į patogeną. Nors šios transkriptomikos tyrimų rūšys teikia esminę informaciją apie ląstelių ekspresijos būseną ar pirminius genomikos rodmenis, reikia pripažinti, kad įvairūs po transkripcinės kontrolės lygiai gali prilygti jų svarbai ir nėra įskaičiuoti į šią analizę [82].

Metaboliniai fenotipai yra šalutiniai produktai, atsirandantys dėl sąveikos tarp genetinių, aplinkos, gyvenamos ir kitų veiksnių. Metabolomą sudaro mažos molekulės (pvz., lipidai ar vitaminai), kurios taip pat žinomos kaip metabolitai. Metabolitai yra susiję su energijos perdavimu ląstelėse (metabolizmu), sąveikaujant su kitomis biologinėmis molekulėmis. Metabolomika apibrėžiama kaip medžiagų apykaitos profilių tyrimas lengvai surinktuose biologiniuose mėginiuose, pvz. šlapime, seilėse arba plazmoje. Metabolomas yra labai kintamas ir priklauso nuo laiko. Jis susideda iš daugelio cheminių struktūrų. Svarbus metabolomikos iššūkis yra gauti kokybinę ir kiekybinę informaciją apie įprastomis aplinkybėmis susidarancius metabolitus, kad būtų galima aptikti metabolitų sutrikimus dėl aplinkos veiksnių pokyčių [80].

Metabolomikos disciplina siekiama identifikuoti visą metabolitų arba metabolito metabolinį junginį. Susijęs metabolomikos laukas konkrečiai nagrinėja gyvų sistemų dinaminį metabolinį atsaką į aplinkos veiksnius ar genetinius sutrikimus. Metabolomas yra transkriptomos, proteomos ir interaktyviosios ląstelių integracijos produktas, todėl pateikia ne tik metabolitų komponentų sąrašą, bet ir funkcinius ląstelinės būsenos rodmenis. Kaip vienos iš naujesnių omikos mokslo šakų, metodai, kurie naudojami šių duomenų generavimui vis dar tobulinami ir dažniausiai remiasi masių spektrometrija (MS), branduolių magnetiniu rezonanso (BMR) spektroskopija ir vibracinės spektroskopija, siekiant iširti metabolitų kiekį, kuris ekstrahuojamas iš atskirų ląstelių ar audinių. Atsižvelgiant į labai skirtingą biomolekulių rinkinį ir didelį metabolitų koncentracijos diapazoną, kurį reikia nustatyti, šiuolaikiniai metodai turi užfiksuoti šimtus skirtingų cheminių medžiagų. Nepaisant šių iššūkių ir su tuo susijančių apribojimų, metabolomika tampa populiaria priemone studijuojanti daugelį sistemų, įskaitant augalus, žmogaus raudonąsias kraujo ląsteles ir mikrobus [82].

Apskritai, visi 'omikos' eksperimentiniai metodai gali būti laikomi išsiskiriančiais pagal tris pagrindines savybes, priešingai nei tradicinėse procedūrose. Pirmoji savybė yra tai, kad, skirtingai nuo tradicinių metodų, 'omikos' metodai yra didelio našumo, orientuoti į duomenų

srautą, holistiniai ir naudoja metodiką „iš viršaus į apačią“. Antra savybė yra bandymas suprasti ląstelių metabolizmą kaip vieną „integruotą sistemą“, o ne kaip paprastas atskirų dalių rinkinius, naudojant informaciją apie ryšį tarp daugelio matuojamų molekulių rūšių [84], ir paskutinė savybė yra tai, kad šie didelio našumo ‚omikos‘ metodai sukuria daug duomenų, o šių duomenų analizė dažnai reikalauja didelių statistinių ir skaičiavimo pastangų [85]. ‚Omikos‘ technologijų atsiradimas paskatino planuoti įvairius eksperimentus, siekiant giliau pažvelgti į genų funkcijas kartu su jų pasireiškimu fenotipe specifiniame biologiniame kontekste [86].

Dauguma augalų biologijos studijų pagrįstos keturiomis pagrindinėmis sritimis – genomika, proteomika, transkriptomika ir metabolomika, kurios suteikia išsamių žinių apie molekulinę sistemų dinamines funkcijas [87]. Augalai sąveikaudami su biotiniaisiais ir abiotiniaisiais veiksniais modifikuoja savo ‚omikos‘ profilius, siekdami apsisaugoti ir išgyventi. Taigi, pagrindiniai ‚omikos‘ siekiai yra išsiaiškinti molekulinę sąveiką, sąryšį su signaliniais keliais ir suprasti, kas jungia specifinius signalus su atsaku biotiniams ar abiotiniams veiksniams.

1.3.1. Proteomika

Baltymai yra gyvybiškai svarbios gyvų organizmų molekulės, nes jos yra pagrindinės ląstelių struktūros formavimo sudedamosios dalys, jos taip pat naudojamos kaip kataliziniai fermentai medžiagų apykaitoje ir kaip signalų perdavimo baltymai reguliuojamuose ląstelių keliuose [88]. Gebėjimas dideliu mastu identifikuoti ir išmatuoti baltymų molekules priklauso nuo naujausių pažangių didelės spartos proteomikos metodikų [85]. Proteomika – visų ląstelės baltymų raišką, modifikacijas, kiekybę bei sąveiką su kitais baltymais nagrinėjantis mokslas.

Terminas „proteoma“ arba „proteomika“ pirmą kartą buvo paminėtas 1995m. [89], tam kad būtų galima pateikti analogiją su genomika ir transkriptomika kaip didelės apimties baltymų tyrimo priemone, ypač nustatyti jų funkcijoms ir struktūroms [90; 91]. Dabar proteomikos terminas minimas jau daugiau nei 20 metų, o daugelis pagrindinių technologinių sprendimų, naudojamų proteomikos tyrimams, yra šiuolaikiniai arba sukurti šiek tiek anksčiau.

Proteominė analizė pagrįsta keturiais technologiniais sprendimais – (1) greita ir paprasta procedūra, skirta mažiems baltymų kiekiams iš kompleksinių mišinių valyti, (2) greitas ir jautrus būdas generuoti ribotą, bet pakankamą struktūros informaciją iš dominančių baltymų, (3) prieigą prie išplėstų baltymų arba DNR sekos duomenų bazių ir (4) kompiuterinius algoritmus, galinčius transliuoti ir susieti DNR sekos kalbą su įvairių tipų baltymų struktūros informacija, tokia kaip amino–galo amino rūgščių seka arba vidinės peptidų sekos, aminorūgščių kompozicijos, peptidų masės pirštų atspaudų, MS fragmentacijos modelių arba pasirinktų peptidų sekos žymių. Šie

keturi principai, kuriais pagįsta ſiuolaikinę proteomika, buvo sukurtos skirtingais laikotarpiais [92].

Pagrindinis proteomikos tikslas – nustatyti ir išmatuoti kiekvieno baltymo, kurį koduoja genomas, kiekį ląstelėje. Pagrindiniai dažniausiai naudojami laboratoriniai metodai, yra dvikryptė gelio elektroforezė ir masių spektrometrija. Taip pat buvo įdiegtos didelės našumo, kiekybinės, „western-blot“ metodikos, tačiau tam reikia ypatingų pastangų ir išteklių [82].

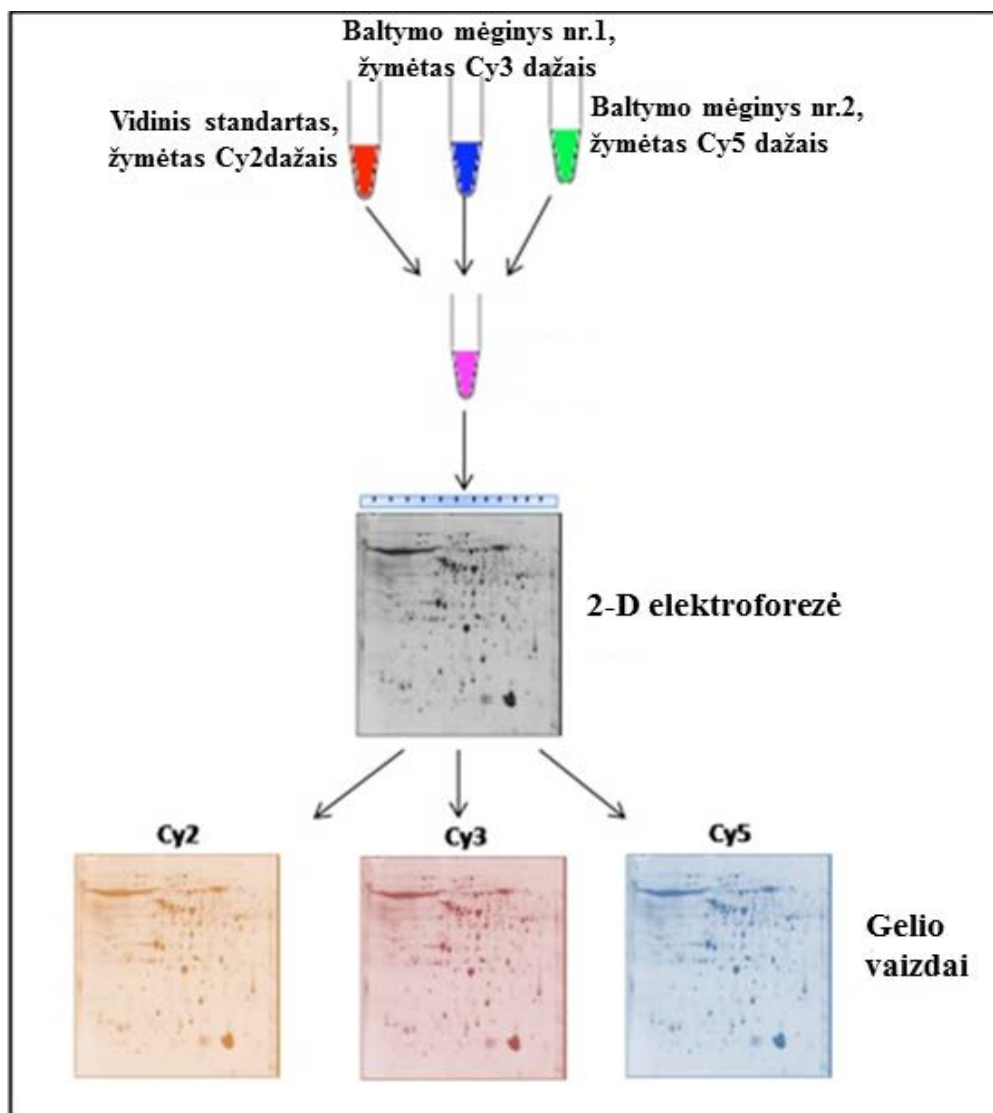
1.3.2. Dvikryptė baltymų elektroforezė

Dabartiniai proteomikos tyrimai yra susiję su sisteminiu visų konkrečių ląstelių, audinių ar biologinių sistemų baltymų profilių analizavimu tam tikru metu [93] ir reikalauja, stabilių ir didelio kiekio baltymų paruoſimo metodų. Baltymų atskyrimas gali būti atliekamas naudojant dviejų dimensijų (2–D) poliakrilamido gelio elektroforezė (2–D PAGE), kaip standartinį baltymų atskyrimo ir detekcijos būdą [94], kuris leidžia vienu metu vietoje palyginti atrinktus ir pažymėtus baltymus skirtinguose miſiniuose [95]. Œi metodika atskiria baltymus pagal du nepriklausomus parametrus: pirmiausia pagal izoelektrinį tašką (pI), naudojant izoelektrinį fokusavimą (IEF), o vėliau pagal molekulinę masę (MM) atliekant natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė (SDS–PAGE) [90; 94; 96; 97; 98]. Be to, 2–DE pateikia nepažeistų baltymų duomenis, kuris atspindi ne tik baltymų kiekio pokyčius, bet ir jų izoformas ar posttranslacinius modifikacijas [99].

2–D gelio elektroforezės metodas pirmą kartą buvo panaudotas 1975 m. [100] ir leido aptikti tik kelis ſimtus baltymų po jų atskyrimo, o tai apima tik „mažo sudėtingumo“ proteomas. Neseniai mokslininkams pavyko patobulinti ſį metodą pritaikius įvairius fluorescencinius dažus, naudojamus 2–D fluorescencijos skirtumo gelio elektroforezei (2–D DIGE), kurie leido patobulinti gelio baltymų analizės apimtį ir jautrumą [101].

2–DE yra vienintelis būdas, galintis atskirti sudėtingus baltymų miſinius, turinčius daugiau nei tūkstantį komponentų. Paprasto eksperimento metu prieš atliekant 2–D elektroforezė, du mėginiai yra pažymimi skirtingais fluorescuojančiais dažais (dažniausiai Cy3 ir Cy5) bei lygiagrečiai mėginiams pažymimas ir vidinis standartas, kuris žymimas atskiru dažu (dažniausiai Cy2) ir naudojamas kiekybinei analizei [95]. Atlikus pažymėtų mėginių 2–D elektroforezė yra nustatomi taškai ir sukuriamas 2–D elektroforezės duomenų bazė kaip orientacinis baltymų „žemėlapis“, kuris atvaizduojamas kompiuterio ekrane [83] (1.2. pav.). Tada atliekamas baltymų identifikavimas, naudojant biocheminius metodus [83]. Poliakrilamido gelyje esantys individualūs baltymai išpjaunami iš gelio ir suskaidomi į peptidus naudojant proteolitinius fermentus, pvz. tripsiną [98]. Susidarę peptidų fragmentai yra kaip jų pirminio

baltymo pirštų atspaudai. Todėl galima nustatyti peptidų masę, o gauti masės pirštų atspaudai yra naudojami duomenų bazėje, siekiant nustatyti baltymą [83]. Tada šie peptidai gali būti identifikuojami masių spektrometrija, pavyzdžiui, lazerio desorbcijos–jonizacijos bei skrydžio trukmės (MALDI–TOF) arba kvadrupolio skrydžio trukmės (Q–TOF) tandeminės masių spektrometrijos metodu [98].



1.2. pav. 2–D PAGE metodas [102]

Per tris dešimtmečius 2–D PAGE pasirodė esąs patikimas ir veiksmingas baltymų atskyrimo metodas [103]. Tačiau 2–DE analizė turi tam tikrų privalumų ir trūkumų. Aiškus 2–D pranašumas yra tai, kad skirtingiems pavyzdžiams taikoma ta pati procedūra, kuri tam tikru mastu riboja eksperimentinį kintamumą ir sukuria atskirus 2–D vaizdus tame pačiame gelyje [95]. Taip pat ji suteikia galimybę tirti baltymų raišką turint nebrangią aparatūrą [104] ir leidžia atlikti tikslesnius ir jautresnius kiekybinius proteomikos tyrimus. Deja, 2–D PAGE analizė yra daug laiko ir darbo reikalaujantis procesas [103]. Taip pat, taikant šią metodiką yra sunku analizuoti

hidrofobinius membranos baltymus, taip pat labai šarmiškus (turinčius didelį izoelektrinį tašką) baltymus arba didelės molekulinės masės baltymus [104].

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Tyrimui naudotos medžiagos, maitinamųjų terpių ir tirpalų sudėtis

1. Triptonas (Carl–Roth, Vokietija)
2. Mielių ekstraktas (Carl–Roth, Vokietija)
3. Natrio chloridas (NaCl) (Carl–Roth, Vokietija)
4. Sacharozė (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
5. Benzil–amonio–purinas (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
6. Skystas azotas (N₂)
7. Tris (Carl–Roth, Vokietija)
8. Sacharozė (Carl–Roth, Vokietija)
9. Kalio chloridas (KCl) (Carl–Roth, Vokietija)
10. Etilendiamintetraacetatas (EDTA) (Carl–Roth, Vokietija)
11. Polivinilpolipirolidonas (PVPP) (Sigma–Aldrich, JAV)
12. 2–merkaptoetanolio (BME), (Carl–Roth, Vokietija)
13. Fenilmetilo sulfonilo fluorida (PMSF). (Sigma–Aldrich, JAV)
14. Fenolis (Carl–Roth, Vokietija)
15. Amonio acetatas (Carl–Roth, Vokietija)
16. Metilo alkoholis (Carl–Roth, Vokietija)
17. Acetonas (Carl–Roth, Vokietija)
18. Karbamidas (GE Healthcare, JAV)
19. Tiokarbamidas (Sigma–Aldrich, JAV)
20. 3–[(3–cholamidopropil)dimetilamonio]–1–propanesulfonatas (CHAPS), (BioRad, JAV)
21. Ditiotreitolas (DTT) (Carl–Roth, Vokietija)
22. Bradford reagentas (Carl–Roth, Vokietija)
23. Cy5 2, Cy5 3, Cy5 5 fluorescenciniai dažai (Lumiprobe, JAV)
24. Dimetilformamidas (Lumiprobe, JAV)
25. Glicinas (Carl–Roth, Vokietija)
26. Trisma bazė (Carl–Roth, Vokietija).
27. Natrio dodecilsulfatas (SDS) (Carl–Roth, Vokietija)
28. Lizinas (Sigma–Aldrich, JAV).
29. Imobilizuoto pH gradiento (IPG) pH 4–7 tirpalas (GE Healthcare, JAV)
30. Glicerolis (Carl–Roth, Vokietija)
31. Jodoacetamidas (Carl–Roth, Vokietija)
32. Amonio bikarbonatas (NH₄HCO₃) (ABK) (Sigma–Aldrich, JAV)

33. Acetonitrilas (ACN) (Sigma–Aldrich, JAV)
34. Tripsinas (Promega, JAV)
35. Skruzdžių rūgštis (Sigma–Aldrich, JAV)
36. Triptonas (Carl–Roth, Vokietija)
37. Fitoagaras (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
38. Amonio nitratas (NH_4NO_3) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
39. Kalio salietra (KNO_3) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
40. Monokalio fosfatas (KH_2PO_4) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
41. Kalcio chloridas (CaCl_2) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
42. Magnio sulfatas (MgSO_4) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
43. Boro rūgštis (H_3BO_3) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
44. Kobalto (II) chloridas (CoCl_2) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
45. Vario (II) sulfatas (CuSO_4) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
46. Geležies sulfatas (FeSO_4) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
47. Natrio molibdatas (Na_2MoO_4) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
48. Kalio jodidas (KI) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
49. Na_2 –EDTA (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
50. Cinko sulfatas (ZnSO_4) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
51. Mangano sulfatas (MnSO_4) (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
52. Glicinas (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
53. Myo–inositolis (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
54. Nikotino rūgštis (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
55. Piridoksinas (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)
56. Tiaminas (Duchefa Biochemie, Nyderlandai)

Lizogeninė maitinamoji terpė (angl. Lysogeny broth) (LB)

10g/L triptonas, 5g/L mielių ekstraktas, 10g/L NaCl. Terpė sterilinta autoklavuojant.

Murashige'o ir Skoogo maitinamoji terpė (MS) [105]

21 mM NH_4NO_3 , 19 mM KNO_3 , 1,3 mM KH_2PO_4 , 3 mM CaCl_2 , 1,5 mM MgSO_4 , 0,1 mM H_3BO_3 , 0,11 μM CoCl_2 , 0,1 μM CuSO_4 , 0,1 mM FeSO_4 , 1 μM Na_2MoO_4 , 5 μM KI, 0,1 mM Na_2 –EDTA, 30 μM ZnSO_4 , 0,1 mM MnSO_4 , 27 μM glycine, 0,55 mM myo–inositol, 4 μM nicotinic acid, 3 μM pyridoxine, 0,3 μM thiamine, 3,3 μM benzil–amino purinas 88 mM sacharozė, pH 5,8. Terpė sterilinta autoklavuojant.

Agarizuota MS maitinamoji terpė

Į MS maitinamąją terpę pridėta 8 g/l fitoagaro. Terpė sterilinta autoklavuojant.

Ekstrakcijos tirpalas (1)

0,5 M Tris–HCl, 0,7 M sacharozė, 0,1 M KCl, 50 mM EDTA, 2% PVPP, 2% BME, 1 mM PMSF, pH–7,5. BME ir PMSF pridedamas prieš pilant ekstrakcijos tirpalą ant mėginių.

Ekstrakcijos tirpalas (2)

Ekstrakcijos tirpalas (1) be PVPP.

Fenolio tirpalas

60 % fenolis, 0,1% hidroksichinolinas, 10 mM Trisma bazė, pH 7,5.

Elektroforezės pavyzdžių tirpalas

7 M karbamidas, 2 M tiokarbamidas, 4% CHAPS, 40 mM DTT.

Elektroforezės tirpalas

192 mM glicinas, 25 mM Trisma bazė, 0.1% SDS, pH 8,3.

Rehidracijos tirpalas

6 M karbamidas, 2 M tiokarbamidas, 1 % CHAPS.

Ekvilibracijos tirpalas

6 M karbamidas, 30 % glicerolis, 2 % SDS, 50 mM Tris–HCl, pH 8,7.

NaDS–poliakrilamido gelis (10 arba 15 %)

0.3 M Tris–HCl, 10 arba 15 % akrilamidas/bis–akrilamidas, 0,1% SDS, 0.07% TEMED, 0.05 % amonio persulfatas, pH 8,8.

Blukinimo tirpalas

50 mM NH₄HCO₃, 50 % ACN.

Tripsino tirpalas

90 mM NH₄HCO₃, 10 % ACN, 13 ng/μL tripsino.

ACN – skrusdžių rūgšties tirpalas

2 % ACN, 0,08 % skrusdžių rūgštis.

2.2. Tyrimo objektas

Tyrimas atliktas 2016–2018 metais Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės instituto (LAMMC SDI) Sodo augalų genetikos ir biotechnologijos skyriuje ir Atviros prieigos žemės ir miškų jungtinio tyrimų centro (JTC) Biologinių žymeklių laboratorijoje.

Obels ūglių *in vitro* tyrimui naudota naminės obels (*Malus × domestica* Borkh.) veislės ‚Gala‘ genotipas, kuris pasirinktas įvertinus skirtingas adaptacijos ir gebėjimo augti *in vitro* sąlygomis savybes: ūglių pasidauginimo koeficientą bei morfologiją.

Endofitinių bakterijų sąveikos tyrimui pasirinkti du *Bacillus spp.* Oa_4 ir Da_1 bakterijų kamienai, kurie surinkti LAMMC SDI darbuotojų, nuo naminės obels (*Malus × domestica* Borkh.) veislės ‚Gala‘ augalų, auginamų genetinių išteklių sode, taikant tradicinę auginimo technologiją [38].

2.3. Naminės obels ūglių ir endofitinių bakterijų ruošimas

Tyrimams atlikti buvo naudoti du endofitinių bakterijų *Bacillus spp.* kamienai Oa_4 ir Da_1. Dieną prieš inokuliaciją bakterijos pasėtos į specialią LB maitinamąją terpę ir paliktos augti per naktį. Kitą dieną spektrofotometru „*Nanophotometer P330*“ (Implen, JAV) matuotas optinis tankis ir pagal formulę:

$$x = \frac{V1}{V2} \times 1000\mu l$$

kur:

x – skiedimo laipsnis;

$V1$ – reikalinga, galutinė bakterijų koncentracija;

$V2$ – bakterijų koncentracija 1 ml;

1000 μl – reikalingas, galutinis tūris;

skaičiuota kiek kartų gautas bakterijas reikia skiesti, kad 1 ml būtų 10^7 kfv ml^{-1} bakterijų. Tada bakterijos nusodintos centrifuguojant „*Eppendorf Centrifuge 5417R*“ (Eppendorf AG, Vokietija) 10 min. esant $15000 \times g$ ir suspenduotos MS maitinamojoje terpėje.

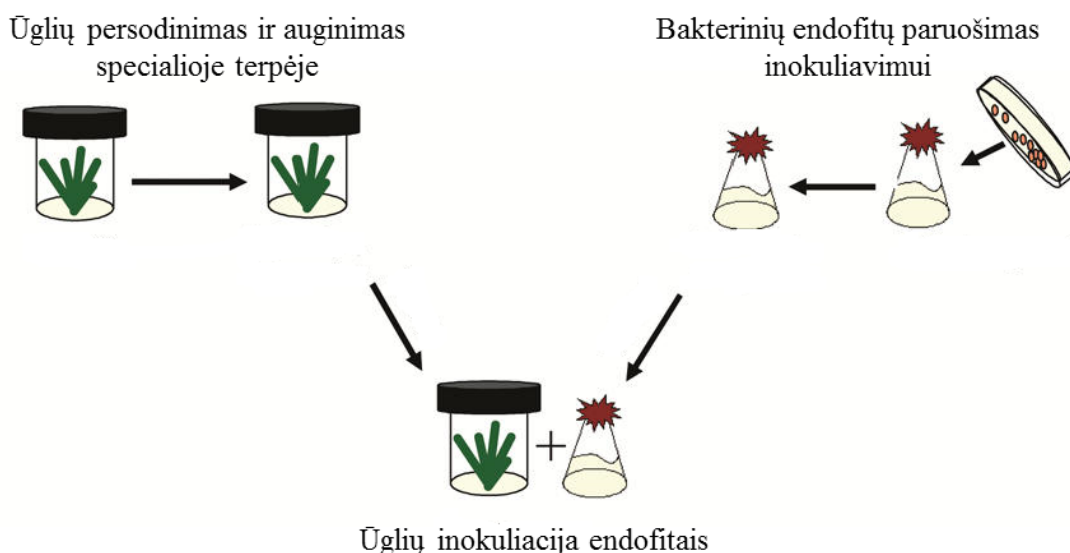
Naminės obels ūgliai auginti ant agarizuotos MS maitinamosios terpės. Ūgliai auginti auginimo kameroje „*MLR 351*“ (Sanyo, Japonija) esant 25 ± 3 °C temperatūrai ir 16 valandų apšvietimo (intensyvumas $50\text{--}150 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) režimui.

2.4. Obels ūglių inokuliacija endofitais ir auginimo sąlygos

Parą po ūglių persodinimo obels ūglių lapkočio pagrindas inokuliuotas 3 μl endofitinių bakterijų suspensijos ir augintas specialioje auginimo kameroje „*MLR 351*“ (Sanyo, Japonija) 7 ir 21 paras, esant 25 ± 3 °C temperatūrai ir skirtingo intensyvumo apšvietimui ($\sim 50 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, ir $\sim 150 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) (2.1. pav.).

Po 7 parų inkubacijos buvo paimti mėginiai proteomos analizei: obels ūglių lapai pasverti po 0,1–0,2 g 2ml mėgintuvėliuose ir saugomi -70 °C temperatūroje.

Po 21 paros inkubacijos įvertinti ūglių masės skirtumai ir pasidauginimo koeficientas, t.y. regeneravusių obels ūglių skaičius iš vieno ūglio.



2.1. pav. Ūglių inokuliacija endofitais pagal Lery ir kt. 2010 [106]

Tyrimams iš viso buvo atlikti 4 eksperimentai, kurių metu buvo keičiamas apšvietimo intensyvumas. 3 eksperimentai atlikti naudojant normalų apšvietimą ($\sim 150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ir 1 naudojant mažesnio intensyvumo apšvietimą ($\sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

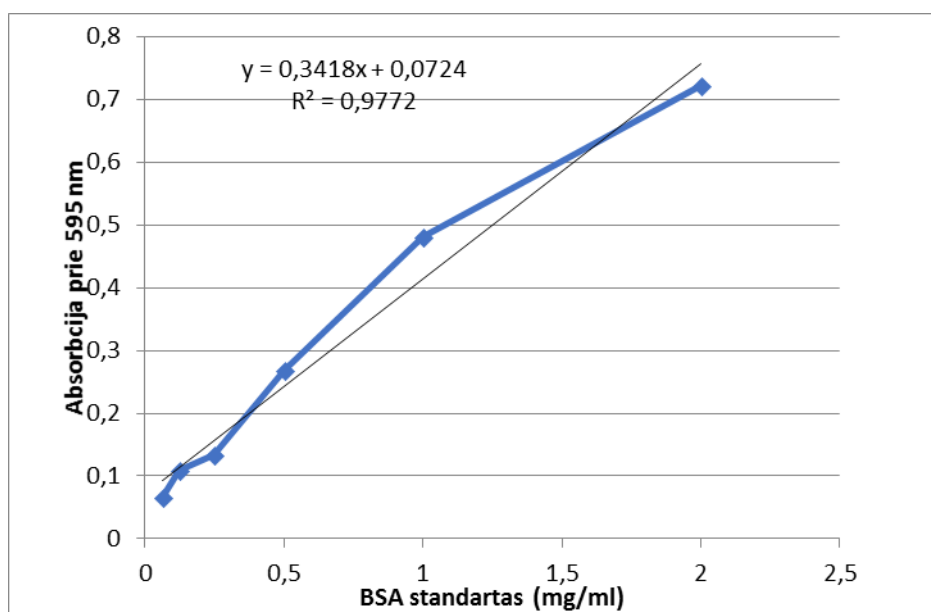
Kiekvieno eksperimento metu proteomos tyrimams buvo auginami po 10 naminės obels ūglių, kiekvienam endofitinių bakterijų kamienui ir kontrolinei grupei, ir po 10 ūglių masės skirtumui ir pasidauginimo koeficientui stebėti. Kontrolinei grupei buvo auginama 50 naminės obels ūglių, kurie nebuvo veikiami endofitinių bakterijų.

2.5. Baltymų pavyzdžių iš obels ūglių ruošimo metodika

Taikant fenolio ekstrakcijos ir išsodinimo amonio acetatu jungtinį metodą baltymai gryninti proteominei analizei [107]. Į mėgintuvėlį su bandiniu įdėti 4 mm šratai ir atšaldyti skystu N_2 . Mėginiai homogenizuoti 3 min., 30 „Mixer Mill MM400“ homogenizatoriumi (Retsch, JAV). Homogenatas suspenduotas 500 μl ekstrakcijos tirpalu (1). Pridėta 500 μl tris prisotinto fenolio tirpalo ir maišant „WiseMix RT-10“ (Wisd, Vokietija) inkubuota 30 min., esant 4°C temperatūrai. Po inkubacijos mėginiai centrifuguoti „Eppendorf Centrifuge 5417R“ (Eppendorf AG, Vokietija) 5 min., $15000 \times g$, esant 4°C temperatūrai. Viršutinė fenolinė fazė surinkta ir ekstrakcija kartota pridėjus 500 μl ekstrakcijos tirpalo (2). Po centrifugavimo į surinktą fenolinę fazę pridėta 5 tūriai metanolyje ištirpinto 0,1 M amonio acetato ir maišoma. Išmaišius mėginiai laikyti 16 valandų, esant -20°C temperatūrai. Centrifugavimu (10 min, $15000 \times g$, esant 4°C) išsodinti baltymai tris kartus valyti šaldytu (-20°C) metilo alkoholiu ir kartą acetonu. Išdžiovinti baltymai tirpinti reguliuojamo greičio ir temperatūros purtyklėje „TS-

100“ (BioSan, Latvija) 1 val. 25 °C 2D elektroforezės pavyzdžių tirpale. Mėginiai centrifuguoti 5 min. esant 15000 ×g ir perkelti į naujus mėgintuvėlius.

Išgryninus baltymus, spektrofotometru „*Nanophotometer P330*“ (Implen, JAV) matuota jų koncentraciją Bradfordo reagentu, naudojant jaučio serumo albumino (BSA) standartą, pagal Bradford metodą [108]. Išgryninti baltymo mėginiai ir 5 BSA standartai paruošti po 5 μl 0,1–1,4 mg/ml (baltymo mėginiams reikia 1 μl baltymo + 4 μl distiliuoto vandens, standartams – 5 μl BSA) koncentracijos nustatymui. Ant kiekvieno mėginio užpilta po 250 ml Bradford reagento ir 30 s maišyta reguliuojamo greičio purtyklėje „*IKA MS 3 basic*“ (IKA, JAV). Mėginiai inkubuoti kambario temperatūroje 5 – 45 minutes ir matuota absorbcija naudojant 595 nm bangos ilgį (baltymų dažų kompleksas yra stabilus iki 60 minučių, ir mėginių absorbcija turi būti išmatuojama per tą laiką). Panaudojant standartus, sudaryta standartinė kreivė (MS Exel programa). Nustatyta mėginių baltymo koncentracija (C), A₅₉₅ reikšmės naudojant k=0.3418 ir r=0.0724 reikšmės, kurios nustatytos pagal standartinę kreivę (2.2. pav.).



2.2. pav. Absorbicijos ir baltymo mėginio koncentracijos standartinė kreivė

2.6. Dvikryptės baltymų elektroforezės metodas

Siekiant nustatyti, kokie baltymai yra išskirti iš mėginių, atlikta dvikryptė elektroforezė gradientiniame gelyje. Ruošiant analitinius gelius kiekvienam pavyzdžiui naudotas 50 μg baltymo kiekis, o jungtinis pavyzdys (naudotas kaip vidinis standartas), sudarytas lygiomis dalimis iš visų pavyzdžių, atitinkančių 50 μg, mišinio. Naudojant minimalaus žymėjimo metodą baltymai pažymėti amino grupei specifiniais Cy2, Cy3 ir Cy5 fluorescenciniais dažais, remiantis 2–D elektroforezės įrangos gamintojo protokolu (*GE Healthcare*). Fluorescenciniai dažai tirpinti

dimetilformamido tirpale ir atskiesti iki 0,4 mM 2–D elektroforezės tirpale. Baltymų pavyzdžiai žymėti atsitiktine tvarka pridėjus 1 µl (0,4 nmol) Cy3 ir Cy5 dažo (žr. 2.1. lentelę), o jungtinis pavyzdys atitinkamai Cy2 dažo į 50 µg baltymo, ištirpinto 10 µl tūryje. Reakcija vykdyta tamsoje inkubuojant ant ledo 30 min. Pridėjus lizino tirpalo mėginių žymėjimo reakcija sustabdyta.

Pavyzdžiai, pažymėti fluorescenciniais Cy2, Cy3 ir Cy5 dažais, sujungti. Preparatyviniam geliui naudota 500 µg nežymėto ir 50 µg Cy2 dažų žymėto jungtinio pavyzdžio. Papildomai į pavyzdžius dėta 2 % IPG, 15 mM DTT ir rehidratacijos tirpalo iki 450 ml galutinio tūrio. Izoelektriam fokusavimui naudotos 24 cm pH 4–7 IPG juostelės. Baltymai frakcionuoti pagal izoelektrinį tašką naudojant Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, JAV) ir palaikant pastovią 20 °C temperatūrą bei 75 µA srovę vienai IPG gelio juostelei. Iš viso izoelektrinis fokusavimas vyksta 52500 kVh. Po izoelektrinio fokusavimo IPG juostelės ekvilibruojamos ekvilibracijos buferyje ir 1 % DTT bei redukuojamos ekvilibracijos buferyje su 4 % jodoacetamido po 20 min. Po ekvilibracijos naudojant *Ettan Dalt Six* (GE Healthcare, JAV) sistemą baltymai atskirti pagal molekulinę masę NaDS–poliakrilamido gelyje.

2.1. lentelė. Mėginių ir dažų paskirstymas IPG juostelėse, ruošiant dvikryptei elektroforezei

Eil. Nr.	Cy 3	Cy 5
1	<i>Bacillus spp.</i> Oa_4 (1)	Kontrolė (1)
2	Kontrolė (1)	<i>Bacillus spp.</i> Oa_4 (1)
3	Kontrolė (1)	<i>Bacillus spp.</i> Da_1 (1)
4	Kontrolė (2)	Kontrolė (1)
5	<i>Bacillus spp.</i> Oa_4 (1)	<i>Bacillus spp.</i> Da_1 (2)
6	<i>Bacillus spp.</i> Da_1 (1)	Kontrolė (2)
7	<i>Bacillus spp.</i> Da_1 (1)	Kontrolė (2)
8	<i>Bacillus spp.</i> Oa_4 (2)	Kontrolė (2)
9	<i>Bacillus spp.</i> Da_1 (2)	<i>Bacillus spp.</i> Oa_4 (1)
10	<i>Bacillus spp.</i> Oa_4 (2)	
11	<i>Bacillus spp.</i> Da_1 (2)	<i>Bacillus spp.</i> Oa_4 (2)
12	Preparatyvinis mišinys	

Auginimo sąlygos: skaičius nurodo kokiomis sąlygomis buvo auginti ūgliai: 1– esant normaliam apšvietimui; 2– esant mažesnio intensyvumo apšvietimui.

Gelių dokumentacija atlikta naudojant Typhoon FLA 9 000 (GE Healthcare, JAV) skenerį taikant 50 µm raišką. Su Cy2 žymėti gelių profiliai skanuoti naudojant 473 nm bangos ilgį ir BPB1 filtrą, su Cy3 – 532 nm, LPG filtrą ir su Cy5 – 635 nm, LPR filtrą.

2.6.1. Dvikryptės baltymų elektroforezės duomenų analizė

Gelių tarpusavio sulyginimas, dispersinė analizė ir baltymų kiekio sulyginimas atliktas naudojant Decyder 2D v.7.0 programinę įrangą (GE Healthcare, JAV). Naudojant diferencinės gelio analizės modulį atlikta visų gelių baltymų detekcija. Taikytas algoritmas, kuris automatiškai sulieja visus tris profilius į vieną bendrą vaizdą ir įvertina baltymų (proteoformų) kiekybines charakteristikas (tūris, plotas, aukštis, nuožulnumas) ir pateikia Cy3 ir Cy5 profilius atitinkančių proteoformų poros tūrio santykį, kuris atitinka dviejų skirtingų pavyzdžių baltymų pokyčius. Matant visų trijų profilių bendrą vaizdą, buvo daroma prielaida, kad daugelio baltymų raiška nepakito ir atlikta santykinė visų proteoformų intensyvumo reikšmių normalizacija.

Gelių duomenims sulyginti ir dispersinei analizei atlikti naudojamas Decyder biologinės variacijos modulis. Analitinio gelio Cy2 profilis sulygintas su preparatyvinio gelio vidiniu standartu. Atlikta statistinė analizė, naudoti Student t–test ir ANOVA metodai. Pagal pasirinktus statistinius kriterijus (student t–test >0,01, ANOVA <0,01) atrinktos proteoformos.

Pasirinktos proteoformos vėliau analizuojamos išplėstinėje duomenų analizėje. Naudojant Decyder 2D v.7.0 programinę įrangos EDA modulį, pasirinkta hierarchinio klasterio sudarymo funkcija ir pagal pasirinktus kriterijus („Hierarchical clustering“ metodas, „Distance metrics“ metodo „Pearson Correlation“ tipas ir „Linkage method“ metodo „Complete Linkage“ tipas) braižoma klasterių diagrama.

2.7. Baltymų identifikavimas masių spektrometrijos metodu

2.7.1. Gelio proteoformų skaidymas tripsinu

Preparatyvinis gelis saugotas 40 % metanolio ir 10 % acto rūgšties tirpale. Diferencine raiška pasižyminčios proteoformos iš preparatyvinio gelio iškirptos rankiniu būdu. Esantys gelyje baltymai suskaidyti tripsinu pagal Shevchenko ir bendraautorių [109] protokolą su nedidelėmis modifikacijomis. Gelio gabaliukai užpilti 100 µl blukinimo tirpalu ir inkubuoti 30 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos skystis nusiurbtas ir atlikta gelio dehidratacija pridėjus 200 µl gryno ACN. Mėginiai palikti inkubuotis kambario temperatūroje, kol geliai tampa balti. Tirpalas nusiurbtas ir mėginiai džiovinti.

Ant mėginių užpilta 40 µl tripsino tirpalo. Mėginiai inkubuoti per naktį vandens vonelėje (GFL, Vokietija) esant 37°C temperatūrai. Pirmiausia peptidai ekstrahuoti 10 min. pridėjus 150 µl dvigubai distiliuoto vandens. Paruošti nauji mėgintuvėliai, į kuriuos po inkubacijos perkeltas skystis nuo gelių. Likę peptidai ekstrahuoti 50µl ACN–FA tirpalu ir inkubuoti kambario temperatūroje 1 val. Po inkubacijos nusiurbtas skystis nuo gelių ir perkeltas į

mėgintuvėlius, kuriuose surinktas prieš tai nusiurbtas skystis. Peptidų ekstrakcija ACN–FA tirpalu kartota dar kartą ir abu ekstrakcijos tirpalai sujungti ir išdžiovinti vakuuminėje centrifugoje „GeneVac miVac DNA Concentrator“ (ALT, JAV).

Išskirti peptidai ruošti tolimesnei masių spektrometrijos analizei. Gauti peptidai ištirpinti 50 µl 2 % ACN ir 0,08 % skruzdžių rūgšties tirpale ir inkubuoti ultragarso vonelėje „Ultrasonic cleaner USC200T“ (VWR, JAV) kambario temperatūroje 30 min. Po inkubacijos centrifuguoti 5 min. 4 °C temperatūroje, esant 20000 x g. Į specialius mėginuvėlius perkelta po 20 µl gauto mišinio ir atlikta masių spektrometrijos analizė.

2.7.2. Baltymų identifikavimas

Peptidai analizuoti skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (LC–MS/MS) metodu, kartu naudojant „Ultimate3000 RSLC“, (Thermo–Scientific, Didžioji Britanija) ir „Maxis 4G“ įrangą su Captive Spray jonizacijos šaltiniu (Bruker–Daltonics, Vokietija).

Baltymų identifikacija atlikta naudojant obels genomo duomenų bazę v.1.0 [7] bei *Matrix* paieškos programinę įrangą (Matrix Science, JAV). Naudoti patikimumo kriterijai: Mascoto kriterijus ≥ 50 , peptidų skaičius ≥ 1 .

Identifikuotų baltymų homologinių genų paieška atlikta taikant *Blast2GO* programinę įrangą [110]: naudojant NCBI Protein duomenų bazę ir BLAST algoritmą atlikta baltymų sekų anotacija ir GO terminų paieška.

Gauti GO terminai sugrupuoti su REVIGO programa [111] laikantis šių parametų: semantinio panašumo griežtumo lygis – 0,7, referencinė duomenų bazė – *A. thaliana*, semantinis panašumas paskaičiuotas pagal *SimRel* dydį.

Genų sąveikos įvertintos panaudojant Stringo duomenų bazėje sukauptus duomenis apie analogiškų *A. thaliana* genų sąveiką [112]. Įidentifikuotų obels genų analogai *A. thaliana* genome pasirinkti remiantis duomenų bazės „GDR Cyc Pathways Database“ v. 1.0.2–w duomenimis.

2.8. Bioinformatinė ir statistinė analizė

Atliktų matavimų duomenys sukaupti ne mažiau kaip 4 eksperimentais. Duomenų vidurkis ir standartinė paklaida nustatyti ir grafiškai pateikti taikant kompiuterinę *Microsoft Excel* programą.

Taikant SPSS (IBM) programą atlikta dispersinė duomenų analizė (naudotas $p < 0,05$ ir $0,01$ patikimumo lygmuo). Tikslus pakartojimų skaičius ir statistinės analizės patikimumo lygmuo nurodytas prie konkrečių duomenų, pateiktų tyrimo rezultatų aptarimo dalyje.

Naudojant *Decyder 2D v.7.0* programinę įrangą atliktas gelių tarpusavio sulyginimas, dispersinė analizė ir baltymo kiekio įvertinimas. Taip pat, naudojant šios programos EDA modulį braižyta hierarchinio klasterio diagrama. Baltymų identifikacija atlikta naudojant obels genomo duomenų bazę v.1.0 bei *Matrix* paieškos programinę įrangą.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Endofitų įtakos vertinimas ūglių augimo savybėms ir morfologijai

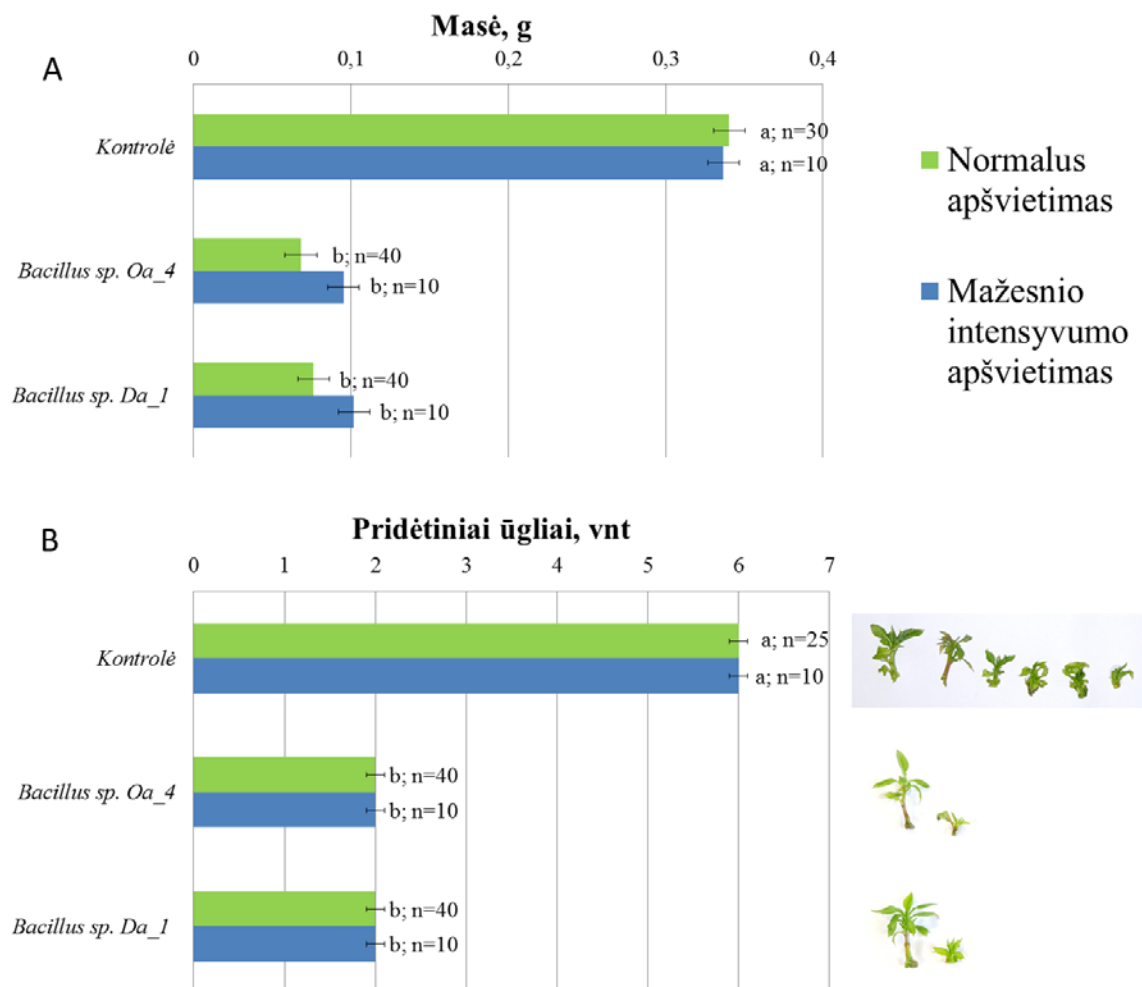
Endofitinės bakterijos yra plačiai paplitusios tarp augalų. Jos kolonizuoja augalą ir nesukelia ligų [113]. Endofitų ir jų kolonizuojamo augalo sąveika buvo tiriamą, siekiant suprasti jų tarpusavio ryšius [36]. Žinoma, kad endofitinės bakterijos turi keletą mechanizmų, kuriais gali skatinti augalų augimą, taip pat jos didina prisitaikymą prie aplinkos sąlygų sukkelto abiotinio ir biotinio streso [114; 115]. Fernandesas su bendraautorais parodė, kad bakteriniai endofitai *Burkholderia phytofirmans* PsJN padidina vynuogių augalų atsparumą šalčiui, keičiant fotosintetinį aktyvumą ir angliavandenių metabolizmą [116]. Naveedas su bendraautorais nustatė, kad bakterijos buvimas kviečių augaluose, augintuose esant sumažintomis drėkinimo sąlygomis, skatina augalų aklimatizaciją, dėl kurios sumažėja ląstelių pažeidimas, padidėja fotosintezės aktyvumas ir kaupiasi su šalčio stresu susiję metabolitai, tokie kaip krakmolai, prolina ir fenolio junginiai [117]. Tai, kad augalų ir endofitinių bakterijų sąveika yra naudinga tiek augalui šeimininkui, tiek jį kolonizuojančiai bakterijai, žinoma jau seniai. Tačiau *in vitro* sąlygomis endofitų poveikis augalui šeimininkui gali tapti ir patogenišku. Endofitų pašalinimas iš audinių yra sudėtingas procesas, todėl neigiamas endofitinių bakterijų poveikis *in vitro* gali trukdyti augalų perkėlimui į *in vitro* sąlygas. Priežastys, kurios apsprendžia endofitų neigiamą poveikį augalui *in vitro* dar yra mažai tyrinėtoms. Galimai augalo ir bakterijų sąveikos pasikeitimas yra susijęs su aplinkos sąlygų pasikeitimu. Yra žinoma, kad augalo sąveikai su mikroorganizmais, tarp jų ir patogenais, yra reikšmingas apšvietimas [118].

Šiuo tyrimu įvertintas obels filozferos endofitinių bakterijų *Bacillus* spp. kamienų Oa_4 ir Da_1 poveikis naminės obels ūglių biomasei ir pridėtinių ūglių skaičiui po 21 dienos inkubacijos *in vitro*, esant skirtingoms apšvietimo sąlygoms. Gauti rezultatai rodo, kad naminės obels ūglių biomasės prieaugį ir pridėtinių ūglių skaičių abu *Bacillus* spp. bakterijų kamienai slopino, esant ir normaliam, ir mažesnio intensyvumo apšvietimui (žr. 3.1. pav).

Esant normaliam apšvietimui *Bacillus* sp. Oa_4 bakterijos lėmė 4,4 kartus, o *Bacillus* sp. Da_1 3,4 kartus mažesnę biomasės prieaugį, palyginti su kontroliniais ūgliais. *Bacillus* sp. Oa_4 kamienas ~3,1 kartus slopino ūglių augimą, o *Bacillus* sp. Da_1 ~2,7 kartus, palyginti su kontrole, tačiau ūglių morfologiniai pažeidimai nebuvo nustatyti.

Esant mažesnio intensyvumo apšvietimui, didesnių pokyčių nepastebėta. Tiek *Bacillus* sp. Oa_4, tiek *Bacillus* sp. Da_1 bakterijų kamienai taip pat slopino naminės obels ūglių biomasės prieaugį ir pridėtinių ūglių skaičių. *Bacillus* sp. Oa_4 kamienas 3,5 karto slopino biomasės

prieaugį ir ~3,4 karto ūglių augimą, o *Bacillus* sp. Da_1 kamienas 3,3 karto biomasės prieaugį ir ~3,6 karto ūglių augimą palyginti su kontrole.



3.1. pav. Naminės obels ūglių masė (A) ir pridėtinių ūglių skaičius (B) po 21 dienos auginimo su endofitinėmis *Bacillus* spp. Oa_4 ir Da_1 bakterijomis, esant skirtingomis apšvietimo sąlygoms

Pateikti vidurkio ir standartinės vidurkio paklaidos duomenys, gauti panaudojant nuo 10 iki 40 biologinių pakartojimų iš 4 eksperimentų. Vienoda raide pažymėti duomenys, kurie nėra patikimai skirtingi ($p < 0,01$).

Šiuo metu yra mažai žinoma apie su augalais susijusių *Bacillus* spp. bakterijų poveikį. *Bacillus* spp. iš pradžių buvo laikoma tipine dirvožemio bakterija [119]. Yra žinoma, kad keletas *Bacillus* rūšių gamina toksinus, kurie slopina augalų grybelių ir patogenų augimą ir veiklą. Labiausiai ištirtų rūšių yra *B. subtilis* [120]. Taip pat buvo nustatyta, kad *Bacillus* populiacijos taip pat gali skatinti augalų atsparumą, stimuliuodamos augalų šeimininkus arba tarpusavio sąveikas [121]. Augalų šeimininkus taip pat gali paveikti hormonai, kuriuos, kaip žinoma, gamina įvairios mikrobinės rūšys, įskaitant ir *B. subtilis* [122].

Beauregarda ir kiti nustatė, kad *B. subtilis* kolonizuoja *Arabidopsis thaliana* šaknis. Šie tyrėjai nustatė teigiamą *B. subtilis* poveikį *A.thaliana* augimui [123]. Arkhipova su

bendraautorais nustatė, kad dirbtinėje terpėje *B. subtilis* skatina augalų augimą per citokinino hormonų ir lakiųjų, kurie keičia augalų hormonų homeostazę, sekreciją [124]. Kiti tyrėjai nustatė, kad *B. subtilis* gali tiesiogiai užkirsti kelią bakterijų patogenų užkrėtimui [125]. Baisas ir kiti ištyrė, kad *B. subtilis* išskiria surfaktantą, kuris veikia kaip antimikrobinis preparatas nuo patogenų, tokių kaip *Pseudomonas syringae* [126]. Taip pat, buvo nustatyta, kad *B. subtilis* gali netiesiogiai apsaugoti augalus, sukuriant sisteminį atsparumą, kuris suteikia augalų apsaugą nuo daugelio patogenų [127;128].

Mūsų tyrimo metu gauti rezultatai rodo, kad visais atvejais bakterijų *Bacillus* spp. Oa_4 ir Da_1 kamienai *in vitro* sąlygomis slopina augalų augimą ir pridėtinių ūglių skaičių. Tai rodo, kad šie bakterijų kamienai *in vitro* sąlygoms gali veikti patogeniškai arba gali netiesiogiai sukelti augalams stresą. Kadangi, morfologiniai pažeidimai būdingi patogenezei (deformuoti audiniai, nekrozės) obels ūgliams nebuvo nustatyti, bet buvo aiškus ūglių augimo slopinimas galima teigti, kad *Bacillus* spp. Oa_4 ir Da_1 bakterijų kamienų ir obels sąveika *in vitro* sąlygomis nėra suderinama, t.y. šios bakterijos nėra patogenai, tačiau obels ūgliams sukelia stresą ar kitaip slopina jų augimą. Ankstesni tyrimai taip pat parodė, kad *Bacillus* sp. Oa_4 bakterijų kamienas slopino obels ūglių augimą [129], tačiau *Bacillus* sp. Da_1 kamieno slopininatis poveikis nebuvo tirtas.

Žinoma, kad *in vitro* aplinkos streso augalui požymis – ADJ kaupimas ląstelėje, kuris gali sukelti sulėtėjusį augalo augimą, pagreitinti audinių senėjimo procesus ir fiziologinį atsaką ir slopinti augalo audinių regeneraciją [33]. Gali būti, kad mūsų tyrimo metu, obels ūglių ląstelėse kaupėsi ADJ. Tai galėtų paaiškinti ūglių augimo ir regeneracijos slopinimo procesus. Tolimesniuose tyrimuose reikėtų atlikti ir ADJ kaupimosi obels ūglių ląstelėse tyrimus, kurie galėtų paneigti arba patvirtinti šią prielaidą.

3.2. Obels ląstelių visuminė baltymų analizė dvikryptės baltymų elektroforezės metodu

Endofitinių bakterijų ir obels ląstelių sąveikos tyrimuose naudojami modernūs metodai, tokie kaip proteomos analizė, atskleidžia obels ląstelių visuminius genų raiškos pakitimus baltymų lygmenyje ir sudaro galimybę detaliam išsiaiškinti endofitinių bakterijų poveikį obels ląstelėms pirminės sąveikos metu.

Atlikta keletas tyrimų, kuriuose nagrinėta visuminė genų raiška augalo ir endofitinės bakterijos sąveikos metu. Heazlewoodas su benrautoriais ištyrė vairo (A.thaliana) mitochondrijų funkcijas ir nustatė didelę pakitusios raiškos baltymų grupę. Eksperimento metu buvo identifikuota 416 baltymų, kurie susiję su DNR sinteze, transkripcijos reguliavimu,

baltymų komplekso surinkimu ir ląstelės signalų perdavimu [130]. S. Timmuska ir E. G. H. Wagneris nustatė augalų genų raišos pokyčius, sukeltus po inokuliacijos su augalų augimą skatinančiomis rizobakterijomis. Šie mokslininkai identifikavo ankstyvo atsako į dehidrogenazę 15 (angl. early responsive to dehydration (ERD15)) baltymą, kurio raiškos pokyčiai anksčiau buvo nustatyti atsako į sausros sukeltą stresą metu [131]. S. Kandasamis su bendraautoriais analizavo molekulinę ryžių ląstelių ir *Pseudomonas fluorescens* bakterijos sąveiką ir identifikavo baltymus, dalyvaujančius apsauginiame ir metabolizmo procesuose [132].

Šiuo tyrimu diferencine dvikrypte baltymų elektroforeze ląstelės baltymų pavyzdžiai frakcionuoti rūgštiniame pH gradiente (pH 4–7). Gelyje rastos vidutiniškai 2287 ± 142 proteoformos. Gelius palyginus pagal vidinį standartą nustatytos vidutiniškai 1962 ± 138 proteoformos. Statistine duomenų analize įvertinus skirtumus tarp šešių eksperimento grupių (nurodytų 3.2. pav.) nustatyta 111 proteoformų, kurioms būdingi patikimi ($p < 0,01$) ir didesni kaip du kartus baltymų kiekio pakitimai (žr. 3.1. lentelę).

Diferencine raiška pasižyminčios proteoformos suskaidytos tripsinu ir atlikta peptidų analizė skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos metodu. Vienareikšmiškai identifikuotos 49 proteoformos, kurios atitiko 38 unikalius obels genus. Du genus atitiko po dvi proteoformas, vieną geną – trys proteoformos ir dar vieną geną – aštuonios proteoformos. Remiantis obels genų anotacija charakterizuoti 38 baltymai. Nustatytas vienas nežinomos funkcijos baltymo genas, kurio raiška ženkliai pakito po inkubacijos su *Bacillus* sp. *Oa_4* kamieniu, ypač esant mažesnio intensyvumo apšvietimui. Identifikuotų 49 proteoformų duomenys šešių eksperimento grupių bandiniuose pateikti 3.2. paveiksle.

3.1. lentelė. Proteomos tyrimu identifikuoti diferencinės raiškos baltymai

Proteo – formos Nr.	Malus peptido Nr.	Mascot kriterijus	Pep – tidų sk.	SA [%]	MM / pI	A. thaliana hologo Nr.	Baltymo pavadinimas ¹	Baltymo simbolis
6	MDP0000437009	238	6	13,1	31,3 / 5,8	AT2G19770.1	Profilinas–5	PRF5
7	MDP0000399295	129	2	10,1	20,7 / 5,1	AT4G39730.1	PLAT domena turintis baltymas 1	PLAT1
8	MDP0000631455	844	14	34,1	61,9 / 5,2	AT2G28000.1	60 alfa šaperonas	CPN60A
9	MDP0000303602	366	7	26,4	32,3 / 4,9	AT1G47980.1	Dehidratacijos indukuojamas baltymas	
12	MDP0000327231	857	12	40,2	41,4 / 8,5	AT2G05990.2	Enoilo–ACP reduktazė 1	ENR1
15	MDP0000085889	409	10	30,1	28,5 / 6,8	AT2G30200.1	S–malonilo transferazė	MCT
16	MDP0000248778	339	7	45,9	20,7 / 8,3	AT3G20390.1	Aktyvaus tarpininko deaminazė	RidA
18	MDP0000322220	742	17	19,9	118,9 / 5,9	AT5G02500.1	70 kDa temperatūrinio šoko baltymas 1/8	HSC70–1
19	MDP0000220163	99	2	19,8	14,4 / 9,5	AT3G52590.1	Ubikvitinas	UBQ1
22	MDP0000096349	138	3	17,4	24 / 6,2	AT2G47730.1	Glutationo S–transferazė	GSTF8
24	MDP0000942516	140	3	25,8	17,5 / 5,6		Giminingas alergenui Pru av–1	Pru av–1
26	MDP0000944409	141	3	16,6	51,7 / 6,2	AT2G39730.1	Rubisko aktyvazė	RCA
28	MDP0000231666	135	3	9,4	52,5 / 5,3	AT1G47128.1	Žemos temperatūros aktyvuotas	RD21A
31	MDP0000509613	493	8	55,2	21,4 / 6,5	AT5G54500.1	Flavodoxinui gimininga chinono reduktazė	FQR1
32	MDP0000942516	140	3	25,8	17,5 / 5,6		Giminingas alergenui Pru av–1	Pru av–1
33	MDP0000942516	140	3	25,8	17,5 / 5,6		Giminingas alergenui Pru av–1	Pru av–1
35	MDP0000525934	1137	21	53,2	49,4 / 5,1	AT5G19780.1	Tubulinas alfa 5	TUA5
37	MDP0000295543	443	6	54,1	17,6 / 5,4	AT1G24020.2	Panašus į dominuojantį latekso baltymą 423	MLP423

Proteo – formos Nr.	Malus peptido Nr.	Mascot kriterijus	Pep – tidų sk.	SA [%]	MM / pI	A. thaliana hologo Nr.	Baltymo pavadinimas ¹	Baltymo simbolis
42	MDP0000941173	780	18	44,7	54,2 / 7	AT1G19920.1	ATP sulfurilazė 2	ATPS2
45	MDP0000124634	228	6	30,5	25,1 / 5,2	AT2G03440.1	Panašus į noduliną 1 baltymas	NRP1
47	MDP0000291593	261	5	19,3	30 / 8,4	AT2G31570.1	Glutatio peroksidazė	GPX2
49	MDP0000942516	140	3	25,8	17,5 / 5,6		Giminingas alergenui Pru av–1	Pru av–1
50	MDP0000291807	1409	22	48,6	58,3 / 6,6	AT5G14780.1	Formato dehidrogenazė	FDH
51	MDP0000291807	1409	22	48,6	58,3 / 6,6	AT5G14780.1	Formato dehidrogenazė	FDH
52	MDP0000487384	1420	24	65	50,3 / 4,8	AT5G23860.2	Tubulinas beta 8	TUB8
55	MDP0000933051	798	16	42,3	45,6 / 6,3	AT1G69740.2	5–aminolevulininės rūgšties dehidratazė	ALADH1
62	MDP0000878750	104	2	7,2	35,8 / 6	AT2G41530.1	S–formilglutatio hidrolazė	SFGH
64	MDP0000160664	198	3	31,6	19,5 / 4,9	AT3G04780.1	PITH domeną turintis baltymas	
70	MDP0000797759	97	3	20,9	16,8 / 5,6	AT2G21660.2	Glicino prisotintas RNR surišantis baltymas 7	GRP7
74	MDP0000709748	117	3	14,2	31,2 / 5,5	AT3G53620.1	Pirofosforilazė 4	Ppa4
78	MDP0000312569	291	5	52,3	17,7 / 5		Giminingas alergenui Pru av–1	Pru av–1
79	MDP0000422652	581	15	30,7	65,5 / 5,7	AT1G62740.1	Hsp70–Hsp90 organizuojantis baltymas 2	Hop2
81	MDP0000687873	90	3	16,4	26,6 / 5,3	AT3G60450.1	Panašus į fosfoglicerato mutazę baltymas	
82	MDP0000213223	188	3	9,1	41,1 / 4,6	AT5G17710.1	GrpE ko–šaperonų šeimos baltymas	
84	MDP0000619608	174	3	22,6	22,8 / 4,7	AT1G17860.1	Kunitz šeimos tripsino ir proteazių slopiklis	KTI
85	MDP0000619608	174	3	22,6	22,8 / 4,7	AT1G17860.1	Kunitz šeimos tripsino ir proteazių slopiklis	KTI
86	MDP0000188674	482	9	46	25,8 / 5,1	AT5G02790.1	Glutatio S–transferazė L3	GSTL3

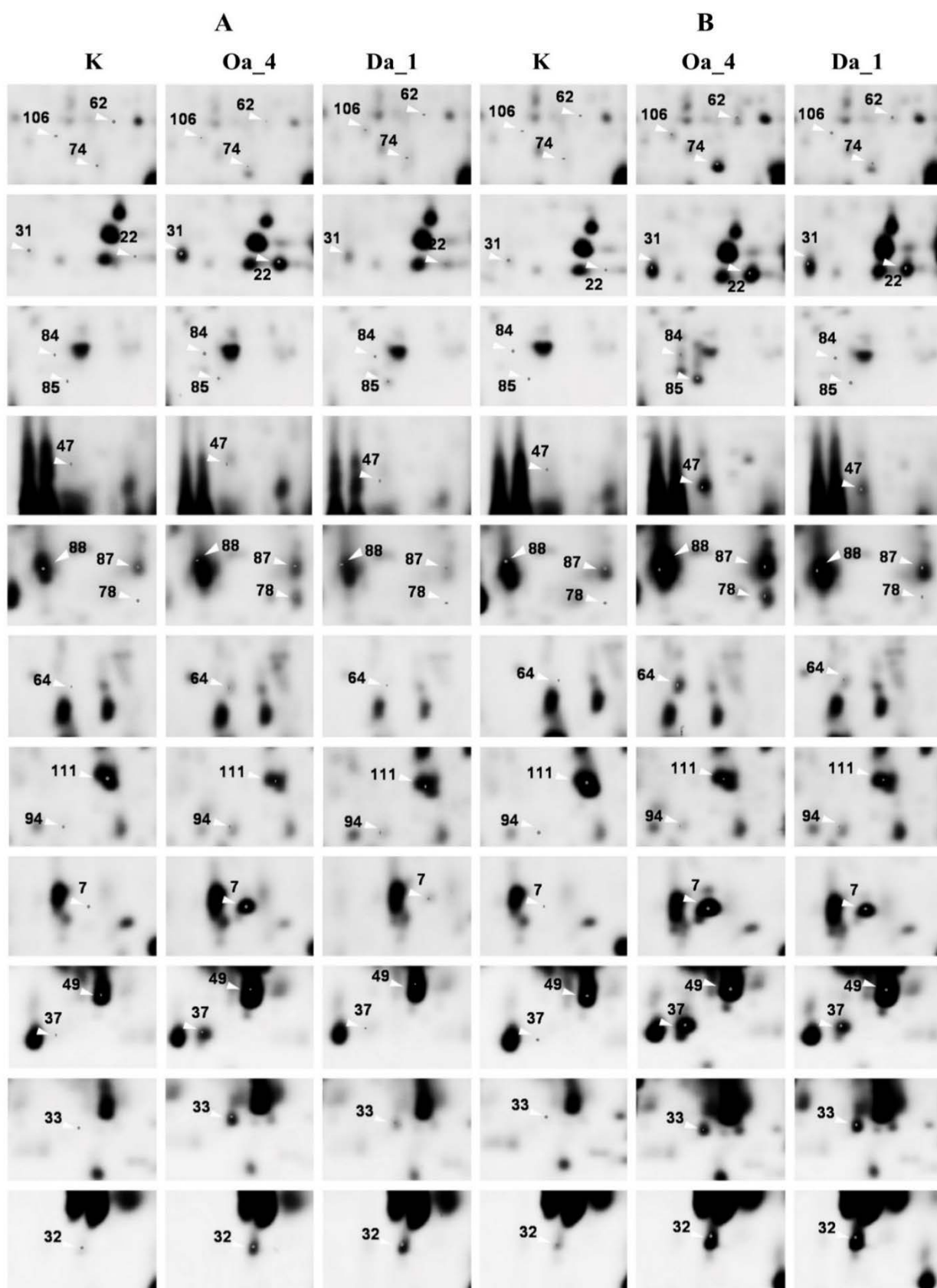
Proteo – formos Nr.	Malus peptido Nr.	Mascot kriterijus	Pep – tidų sk.	SA [%]	MM / pI	A. thaliana hologo Nr.	Baltymo pavadinimas ¹	Baltymo simbolis
87	MDP0000299311	212	4	24	17,6 / 5,7	AT1G24020.2	Panašus į dominuojantį latekso baltymą 423	MLP423
88	MDP0000295540	292	6	52,2	17,6 / 5,7	AT1G24020.2	Panašus į dominuojantį latekso baltymą 423	MLP423
90	MDP0000477969	182	3	11,3	38 / 4,8	AT2G35490.1	Numanomas plastidžių lipidus surišantis baltymas	PAP3
91	MDP0000303602	366	7	26,4	32,3 / 4,9	AT1G47980.1	Dehidratacijos indukuojamas baltymas	
94	MDP0000711379	138	2	14,7	18,1 / 5,3	AT4G33720.1	Cisteino prisotintas sekretuojamas baltymas	CAP
95	MDP0000570395	100	2	4,5	55,3 / 6,1	AT4G16260.1	Numanoma beta–1,3–endogliukanazė	
97	MDP0000222724	361	6	17	43,6 / 7	AT5G24090.1	Chitinazė A	CHIA
103	MDP0000287581	259	5	6,5	64,3 / 6,9	AT5G24090.1	Chitinazė A	CHIA
104	MDP0000287581	259	5	6,5	64,3 / 6,9	AT5G24090.1	Chitinazė A	CHIA
106	MDP0000201631	398	10	41,5	34,1 / 6,1	AT1G19580.1	Gama karboanhidrazė 1	GAMMA CA1
109	MDP0000196554	106	3	6,5	39,8 / 7,7	AT3G29200.1	Chorizmato mutazė 1	CM1
111	MDP0000235602	422	6	40,4	19,7 / 5,7	AT3G27830.1	Ribosomų baltymas L12–A	RPL12–A

¹ Baltymų pavadinimas atitinka *A. thaliana* homologiško baltymo pavadinimą. Sutrumpinimai: SA – identifikuotų peptidų sekų atitikimas *Malus* baltymo sekai; MM – molekulinė masė; pI – izoelektrinis taškas.

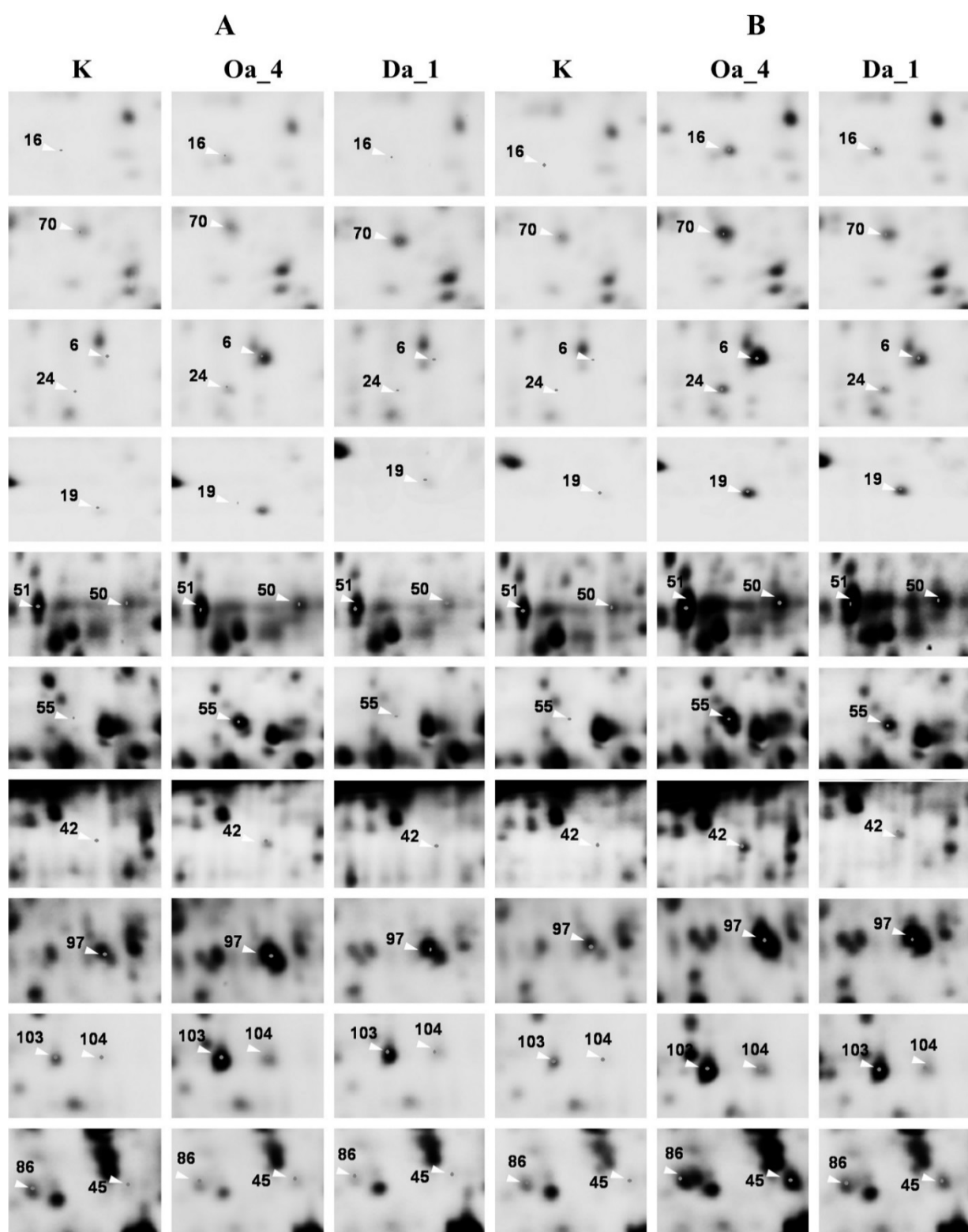


3.2. pav. Diferencinė raiška pasižyminčių 49 proteoformų duomenys keturių eksperimento grupių bandiniuose: kontrolės ir po poveikio su *Bacillus spp.* kamienais Oa_4 ir Da_1 esant skirtingom apšvietimo sąlygom

Pateikti vieno būdingo gelio duomenys iš 4 eksperimente naudotų biologinių pakartojimų. A– esant normalioms apšvietimo sąlygom; B – esant mažesnio intensyvumo apšvietimui.



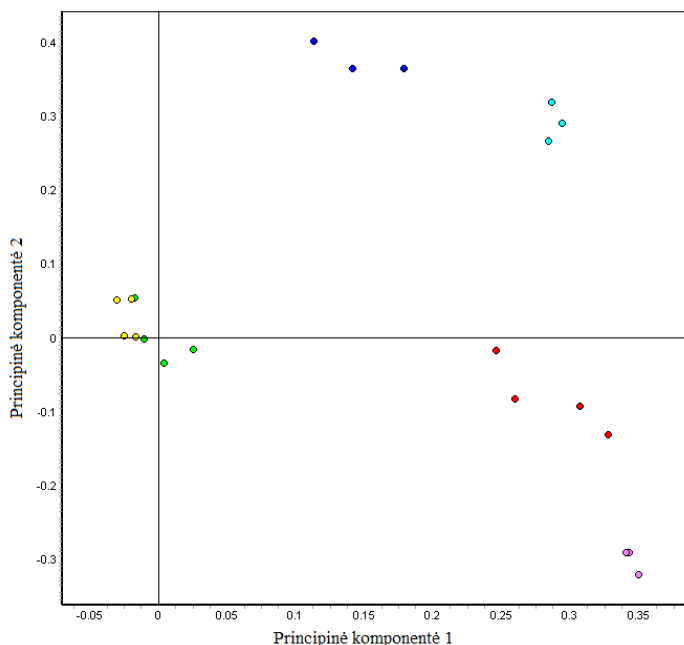
3.2. pav. Diferencinė raiška pasižyminčių 49 proteoformų duomenys keturių eksperimento grupių bandiniuose: kontrolės ir po poveikio su *Bacillus* spp. kamienais Oa_4 ir Da_1 esant skirtingom apšvietimo sąlygo (tėsiny)



3.2. pav. Diferencinė raiška pasižyminčių 49 proteoformų duomenys keturių eksperimento grupių bandiniuose: kontrolės ir po poveikio su *Bacillus* spp. kamienais Oa_4 ir Da_1 esant skirtingom apšvietimo sąlygom (tęsinys)

3.2.1. Principinė komponentių analizė

Atlikta bakterinių endofitų poveikio baltymų raiškai panašumų ir skirtumų analizė tarp eksperimento grupių, taikant principinės komponentių analizės (angl. Principal Component Analysis (PCA)) metodą (3.3. pav.). Panaudojus dvi komponentių ašis nustatyti skirtumai tarp visų eksperimento grupių. Dvi komponentių ašys atitinka didžiausius duomenų skirtumus, pirmoji komponentė – ~0,4, antroji – 0,44. Pagal pirmąją komponentę labiausiai išsiskiria *Bacillus* sp. kamieno Oa_4 poveikis, kuriam būdingi didžiausi baltymų raiškos skirtumai esant mažesnio intensyvumo apšvietimui, lyginant su kontroline grupe. Mažiau, bet panašaus lygio skirtumai būdingi ir *Bacillus* sp. kamieno Da_1 poveikiui, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui, bei *Bacillus* sp. kamienui Oa_4 esant normalioms apšvietimo sąlygoms. Lyginant su kontrolės ūgliais, mažiausiai skirtumų būdinga *Bacillus* sp. kamieno Da_1 poveikiui, esant normaliam apšvietimui. Taigi, pagal pirmąją komponentę ryškiausi skirtumai tarp kontrolinės grupės ir *Bacillus* sp. kamienų Oa_4 ir Da_1 poveikio. Pagal antrą komponentę išryškėja skirtumai tarp abiejų bakterijų kamienų esant tiek normalioms apšvietimo sąlygoms, tiek mažesnio intensyvumo apšvietimo sąlygoms. Didžiausi skirtumai tarp vienos eksperimento grupės biologinių pakartojimų buvo būdingi *Bacillus* sp. kamieno Oa_4 poveikiui, esant normaliam apšvietimui.



3.3. pav. Endofitų panašumų ir skirtumų analizės rezultatai

Spalvų paaiškinimas: žalia – kontrolinė grupė, esant normaliam apšvietimui; geltona – kontrolinė grupė, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui; šviesiai mėlyna – *Bacillus* sp. Da_1 kamienas, esant normaliam apšvietimui; tamsiai mėlyna – *Bacillus* sp. Da_1 kamienas, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui; raudona – *Bacillus* sp. Oa_4 kamienas, esant normaliam apšvietimui; rožinė – *Bacillus* sp. Oa_4 kamienas, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui.

3.2.2. Bakterijų poveikis obels ūglių baltymų raiškai

Hierarchine klasterių analize palyginta visų 49 identifikuotų, diferencine raiška pasižyminčių proteoformų duomenys. Remiantis baltymų kiekio pasikeitimo dėsniniais, išskirtos aštuonios sąlyginės baltymų raiškos grupės (žr. 3.4. pav.). Baltymų kiekio padidėjimas būdingas beveik visoms idenfikuotoms grupėms, išskyrus 5 baltymams priskirtiems 4 ir 8 grupėms, kuriems būdingas baltymų kiekio sumažėjimas.

Pirmąją grupę (33 proteoformas) sudaro baltymai, kurių kiekis, palyginti su kontrolės variantu, padidėja ūgliuose, inkubuotose su *Bacillus* spp. kamienais Oa_4 ir Da_1, tačiau poveikis tarp skirtingų apšvietimo sąlygų skiriasi. Didžiausi baltymų raiškos skirtumai pastebimi po inkubacijos su *Bacillus* sp. Oa_4 kamienu, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui. Taip pat patikimi baltymų raiškos skirtumai po inkubacijos su *Bacillus* sp. Oa_4 kamienu stebimi esant normaliam apšvietimui, bei po poveikio su *Bacillus* sp. Da_1 kamienu, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui. Mažiau, bet taip pat patikimi skirtumai stebimi po inkubacijos su *Bacillus* sp. Da_1 kamienu, esant normalioms apšvietimo sąlygoms. Šioje grupėje didžiausia baltymų raiška stebima žemos temperatūros aktyvuotam baltymui (RD21A), kuris atsakingas už biotinį ir abiotinį atsaką į stresą, taip pat padeda apsisaugoti nuo patogenų [133], ir 70 kDa temperatūrinio šoko baltymas 1/8 (HSC70–1), kuris dalyvauja reguliuojamoje RNR polimerazės II priklausomų genų transkripcijoje [134], bei PLAT domeną turintis baltymas (PLAT1), kuris dalyvauja ląstelių migracijos ir audinių reorganizacijos procesuose [135]. Šioje grupėje, dauguma baltymų yra susiję su atsaku į stresą.

Pažymėtina, kad pirmajai grupei būdingi didžiausi baltymų kiekio pasikeitimai. Po inkubacijos su *Bacillus* sp. Oa_4 kamienu ir esant mažesnio intensyvumo apšvietimui, palyginti su kontrolinės grupės ūgliais, baltymų kiekis padidėjo nuo 2 iki 117 kartų: stipriausiai aktyvinamas PLAT1 (~117 kartus), RD21A (~59 kartus), dar 13 proteoformų kiekis padidėjo daugiau kaip 10 kartų. Po inkubacijos su tuo pačiu kamienu, tačiau esant normaliam apšvietimui, baltymų kiekis padidėjo nuo 1,6 iki 35 kartų. Šioje grupėje taip pat stipriausiai aktyvinami RD21A (~35 kartus), bei PLAT1 (~29 kartus). Po inkubacijos su *Bacillus* sp. kamienu Da_1 abejomis auginimo sąlygomis labiausiai aktyvinamas RD21A (normalus apšvietimas ~24 karto, mažesnio intensyvumo apšvietimas ~124 karto). Nors PLAT1 kiekis taip pat statistiškai patikimai padidėjo po inkubacijos su *Bacillus* sp. Da_1 esant mažesnio intensyvumo apšvietimui, tačiau *Bacillus* sp. Oa_4 inkubacijos metu gautas 3,4 karto didesnis rezultatas (baltymų kiekis padidėjo 117 ir 34 atitinkamai po *Bacillus* sp. kamienu Oa_4 ir Da_1 poveikio, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui). Todėl galima teigti, kad ši baltymų grupė didžiąja dalimi atspindi *Bacillus* sp. Oa_4 kamieno indukuojamą specifiską obels ląstelių atsaką.

Antrą, didžiausią grupę sudaro 35 proteoformos, kurioms patikimi skirtumai nustatyti po inkubacijos su abiem *Bacillus* sp. kamienais, tačiau tik esant mažesnio intensyvumo apšvietimui. Taip pat nemažai patikimų skirtumų stebima ir po poveikio su *Bacillus* sp. kamienu Oa_4, esant normalioms apšvietimo sąlygoms, bei po poveikio su *Bacillus* sp. Da_1 esant skirtingomis apšvietimo sąlygomis. *Bacillus* sp. Da_1 baltymų raiškai turi įtakos tik sumažinus apšvietimą, o esant normalioms apšvietimo sąlygoms, patikimų skirtumų nenustatyta. Didelė baltymų raiška stebima giminingam alergenui Pru-av1 baltymui (Pru-av1) bei 5-aminolevulininės rūgšties dehidratazei (ALADH1), bei keliem neidentifikuotiems baltymams (41 ir 63). Šioje grupėje nustatyta keletas baltymų (PITH domeną turintis baltymas, panašus į noduliną 1 baltymas), kurie susiję su atsaku į stresą [136]. Taip pat šioje grupėje nustatyti mitochondrijų baltymai, ATP sulfūrilaze 2 ir formato dehidrogenazė, kurie susiję su energijos apykaitos pokyčiais [137; 138; 139]. Su nodulinu susijęs baltymas bei tubulino β grandinės baltymas yra susiję su citoskeleto baltymais. Šie baltymai dalyvauja ląstelės reorganizacijos procesuose.

Trečiajai grupei priklauso 17 proteoformų. Patikimi baltymų raiškos skirtumai pastebėti po inkubacijos su *Bacillus* sp. kamienu Oa_4, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui. Čia matomas baltymų kiekio padidėjimas, iš kurių 3-jų kiekis reikšmingai padidėjo daugiau nei du kartus (giminingas alergenui Pru av-1, bei du neidentifikuoti baltymai). Nemažai patikimų skirtumų pastebima ir tarp abiejų *Bacillus* sp. Oa_4 ir *Bacillus* sp. Da_1, taip pat esant mažesnio intensyvumo apšvietimui.

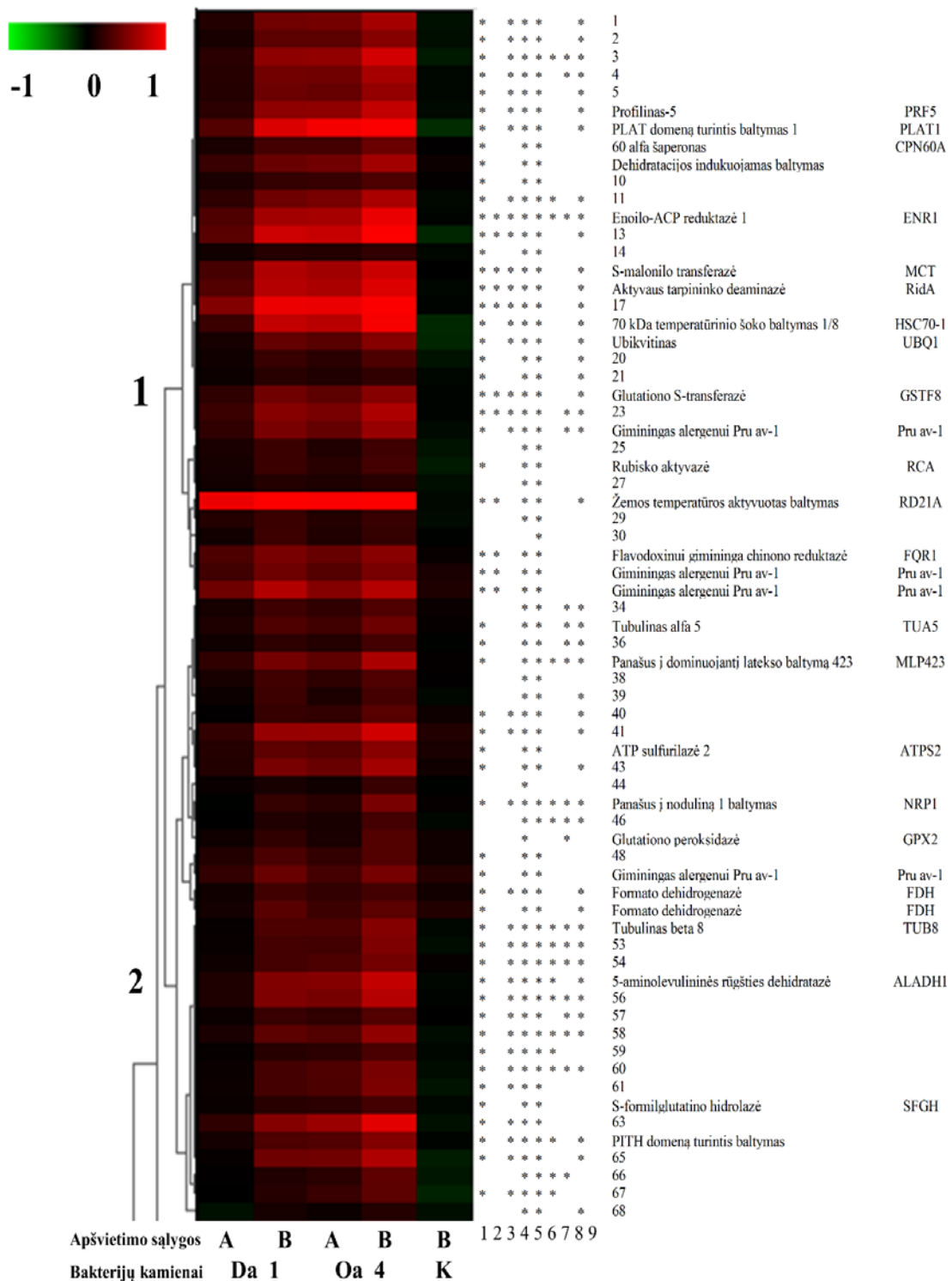
Ketvirtajai grupei priskirtos tik 3 proteoformos, kurių kiekiai palyginti su kontrolės ląstelėmis pakito statistiškai reikšmingai, bet gana nežymiai (po inkubacijos su *Bacillus* sp. Oa_4, esant normaliam apšvietimui sumažėjo 1 kartą, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui padidėjo 1,1 karto, o po inkubacijos su *Bacillus* sp. Da_1, esant normaliam apšvietimui sumažėjo 0,7 karto, o esant mažesnio intensyvumo apšvietimui, padidėjo 1,2 karto). Po inkubacijos su abiem *Bacillus* sp. kamienais Oa_4 ir Da_1 ir esant normaliomis apšvietimo sąlygomis baltymų raiška sumažėjo, o esant mažesnio intensyvumo apšvietimui, padidėjo nedaug. Patikimi skirtumai pastebimi tarp bakterijų esant skirtingam apšvietimui, bei po poveikio su *Bacillus* sp. Oa_4, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui.

Penktajai grupei priklauso tik 2 proteoformos, kurios po inkubacijos su *Bacillus* sp. kamienu Da_1 rodo dvigubai didesnę baltymų kiekį, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui. Patikimi baltymų raiškos skirtumai būdingi tarp *Bacillus* sp. kamienų Oa_4 ir Da_1 esant tiek normaliam apšvietimui, tiek sumažinto intensyvumo apšvietimui. Taip pat patikimi skirtumai pastebimi ir po inkubacijos su *Bacillus* sp. Da_1 kamienu, esant normalioms apšvietimo sąlygoms.

Šeštąją grupę (17 proteoformų) sudaro baltymai, kurių raiška, esant normaliam apšvietimui, patikimai padidėja po inkubacijos su *Bacillus* sp. kamieniu Oa_4. Taip pat esant mažesnio intensyvumo apšvietimui stebimi patikimi baltymų raiškos pokyčiai. Nemažai patikimų skirtumų matoma ir po inkubacijos su *Bacillus* sp. Da_1 kamieniu, esant įvairioms apšvietimo sąlygoms. Patikimų skirtumų po inkubacijos su *Bacillus* sp. Oa_4 ir *Bacillus* sp. Da_1 kamienais, esant skirtingomis apšvietimo sąlygomis, tarp tų pačių kamienų, nenustatyta dėl šiai grupei būdingos didelės variacijos. Iš 17 proteoformų identifikuotos buvo tik 7. Iš jų 3 (Chitinazė A (CHIA), numanoma β – 1,3–endogliukanazė, cisteino prisotintas sekretuojamas baltymas (CAP)) susiję su atsaku į patogenus [140; 141; 142].

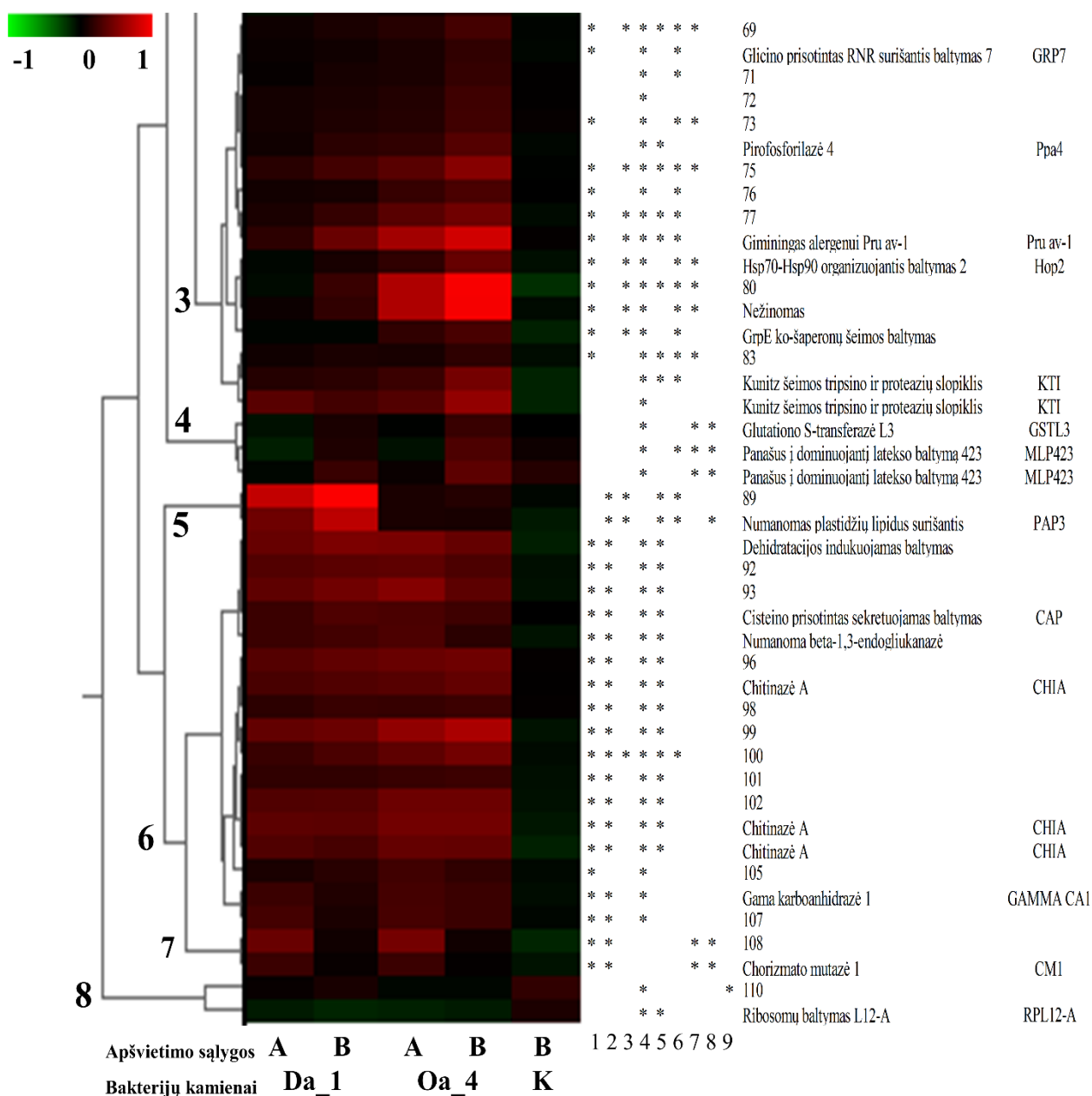
Septintą grupę sudaro tik 2 proteoformos, kurių raiška pakitimai skiriasi po inkubacijos su abiem endofitiniais kamienais, esant normalioms apšvietimo sąlygoms bei tarp tų pačių kamienų, esant skirtingoms apšvietimo sąlygoms. Abi šioje grupėje esančios proteoformos patikimai padidėjo.

Paskutinę, aštuntą grupę sudaro taip pat tik 2 proteoformos, kurioms būdingas baltymų kiekio sumažėjimas po poveikio su abiem *Bacillus* sp. kamienais. Kontrolinėje grupėje, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui stebimas nedidelis baltymų kiekio padidėjimas. Patikimas baltymų kiekio sumažėjimas stebimas tik po inkubacijos su *Bacillus* sp. kamieniu Oa_4, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui. Ryškiausias sumažėjimas stebimas ribosomų baltymo L12–A.



3.4. pav. Diferencine raiška pasižyminčių obels ląstelių proteoformų kiekio hierarchinės klasterių analizės rezultatai

Aštuonios pagrindinės grupės pažymėtos skaičiais kairėje. Spalvinė diagrama rodo baltymo kiekio sumažėjimą (žalia) arba padidėjimą (raudona). Žvaigždutės 1–9 stulpelyje žymi statistiškai patikimą ($p < 0,01$) ir didesnį kaip du kartus baltymų kiekio skirtumą Oa_4 palyginti su kontroline grupe (1), Da_1 palyginti su kontroline grupe (2), Oa_4 ir Da_1 palyginti tarpusavyje (3), Oa_4 palyginti su kontroline grupe, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui (4), Da_1 palyginti su kontroline grupe, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui (5), Oa_4 ir Da_1 palyginti tarpusavyje, esant mažesnio intensyvumo apšvietimui (6), Oa_4 palyginti tarpusavyje, esant skirtingom apšvietimo sąlygom (7), Da_1 palyginti tarpusavyje, esant skirtingom apšvietimo sąlygom (8), kontrolinės grupės, palyginti tarpusavyje, esant skirtingom apšvietimo sąlygom (9); 3 stulpelyje pateikti baltymų pavadinimai, 4 – sutrumpinti baltymų pavadinimai (simboliai) pagal *A. thaliana* atitikmenis.



3.4. pav. Diferencinė raiška pasižymintųjų obels ląstelių proteoformų kiekio hierarchinės klasterių analizės rezultatai (tęsinys)

Pastebėtina, kad ūglių morforlogijos tyrimais patikimų skirtumų tarp bakterijų kamienų poveikio bei apšvietimo sąlygų poveikio ūglių ir endofitų sąveikai nebuvo nustatyta. Tačiau tokie skirtumai akivaizdus baltymų raiškos lygmenyje. Hierarchinės klasterių analizės rezultatai rodo, kad dalis baltymų raiškos pokyčių yra būdingi abiem *Bacillus* genties kamienams ir galimai atspindi šios bakterijų genties ar bendrai augalų ir endofitų sąveikai būdingus procesus. Taip pat yra ir skirtumų tarp tirtų kamienų poveikio, kuris labiau išryškėja sumažinto apšvietimo sąlygomis. Esant mažesnio intensyvumo apšvietimui nustatyta 106 ir 91 patikimi baltymų kiekio skirtumai atitinkamai *Bacillus* sp. kamienams Oa_4 ir Da_1, iš kurių 88 yra būdingi abiem kamienams, o 18 ir 3 būdingi tik atitinkamai Oa_4 ir Da_1. Normaliomis apšvietimo sąlygomis

nustatyta 87 ir 31 patikimi baltymų kiekio skirtumai atitinkamai su *Bacillus* sp. kamienams Oa_4 ir Da_1, iš kurių 29 yra būdingi abiem kamienams, o 58 ir 2 būdingi tik atitinkamai Oa_4 ir Da_1.

3.2.3. Diferencinės raiškos baltymų funkcijos

Tolesnės šių duomenų analizės tikslas – atskleisti genų funkcijų bendrus ypatumus, kurie padėtų suprasti obels ūglių ir endofitų sąveikos sąsajas bei molekulinį mechanizmą. Atliekant analizę taikyti du genų funkcijas ir sąveikas apibendrinantys metodai: biologinių procesų analizė, paremta genų ontologija (GO) ir genų sąveikų vertinimas pasitelkiant *String* duomenų bazėje sukauptus duomenis.

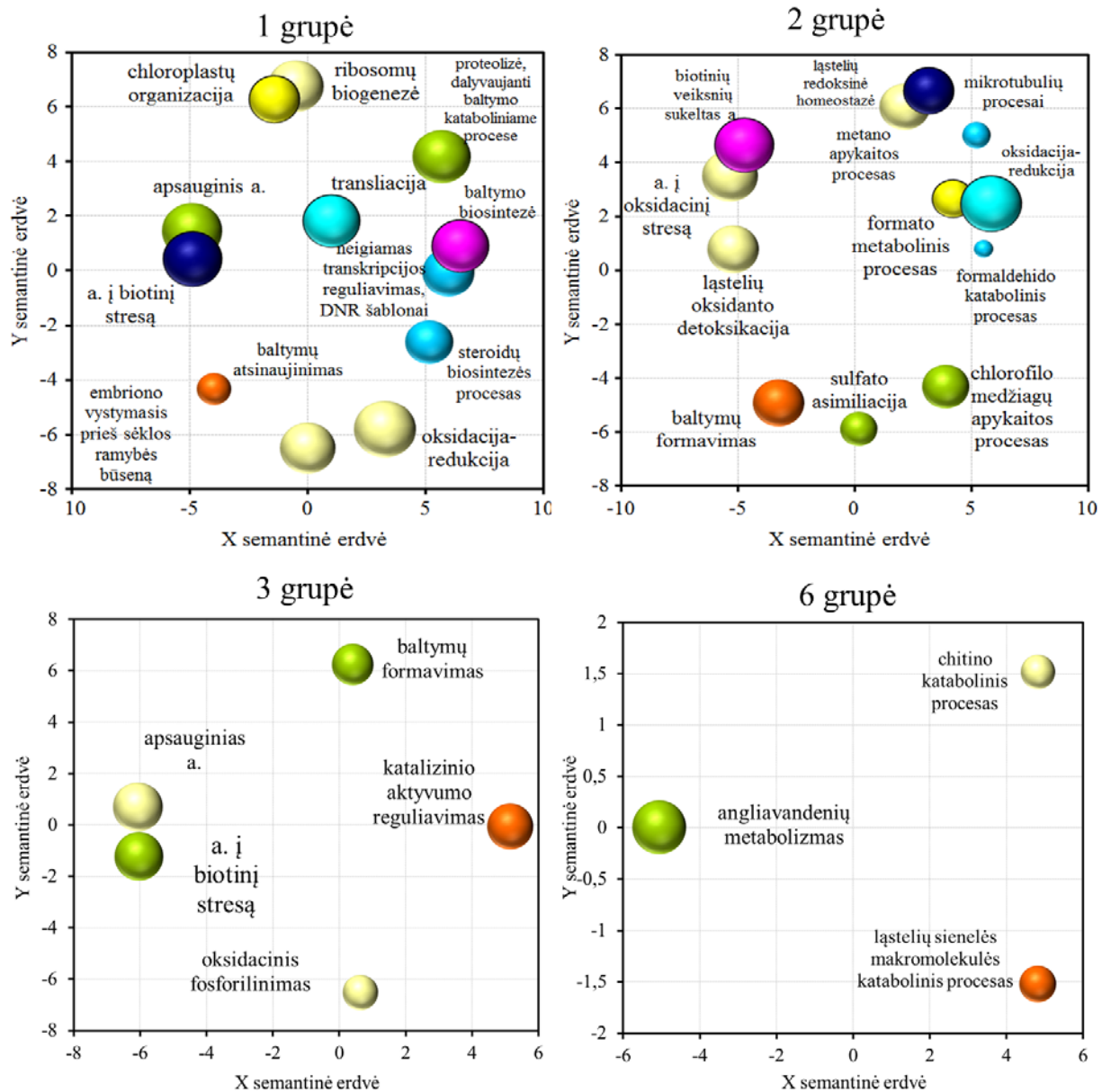
Siekiant įvertinti klasteriu analize nustatytoms genų raiškos grupėms būdingus baltymų biologinių funkcijų ypatumus, GO terminų analizė taikyta atskirai keturioms iš šių grupių (1, 2, 3 ir 6), kurioms priskirta daugiau nei po tris baltymus. Taikant genų ontologijos terminų paiešką, šioms grupėms priskirti atitinkamai 50, 55, 20 ir 10 unikalūs biologinių procesų apibūdinantys GO terminai. Priskirti GO terminai apibendrinti taikant REVIGO algoritmą, vertinantį terminų giminingumo ryšį pagal semantinį panašumą [113]. 3.5. paveiksle pateikti apibendrinti biologinių procesų terminų rezultatai, atskleidžiantys grupėms būdingus tam tikrus genų raiškos panašumus ir skirtumus.

1–ai grupei priklauso didelis identifikuotų unikalų baltymų (16) ir GO terminų kiekis (50), taip pat gautas nemažas biologinių procesų skaičius – dominuoja oksidacijos redukcijos procesai (7,5 % dažnis), taip pat ir apsauginio atsako (6,1 %) procesai. Šioje GO terminų grupėje išsiskiria steroidų biosintezės procesas (0,4 %) bei transliacijos (3,3 %) procesai, nes jų unikalumo kriterijus mažiausias.

2–ai grupei, taip pat būdinga didelė biologinių procesų įvairovė: identifikuoti 13 unikalūs baltymai, ir jiems nustatyti 55 GO terminai ir apibendrinti rezultatai apima 12 terminų. Pagal dažnį dominuoja oksidacijos redukcijos procesai (7,5 %). Su apsauginiu atsaku (6,1 %) susiję procesai turi tokį pat dažnį kaip ir pirmojoje grupėje. Lyginant bendrai, aukštas unikalumo kriterijus (dviejų terminų – didesnis kaip 0,8, o bendrai visų terminų – didesnis kaip 0,5) rodo, kad tarp šiai grupei būdingų procesų yra daug bendro.

3–ai grupei priklauso 8 unikalūs baltymai, kuriems būdingi 20 GO terminai, tačiau apibendrinti rezultatai apima tik 5 terminus. Pagal dažnį čia dominuoja apsauginio atsako (6,1 %) procesai, taip pat reikšmingą dalį sudaro ir atsakas į biotinį stresą (5,2 %).

6 grupei priklauso 7 unikalūs baltymai ir identifiukuota 10 GO terminų, o apibendrinti rezultatai apima 3 terminus. Didžiausią dažnį čia turi angliavandenių apykaitos procesas (4,7 %) ir panašius dažnius turi likę du procesai: chitino katabolizmo (0,07 %) ir ląstelių sienelės makromolekulių katabolizmas (0,11 %). Pastarieji du procesai pasižymi išskirtinumu, nes jų unikalumo kriterijus mažiausias (0,09).

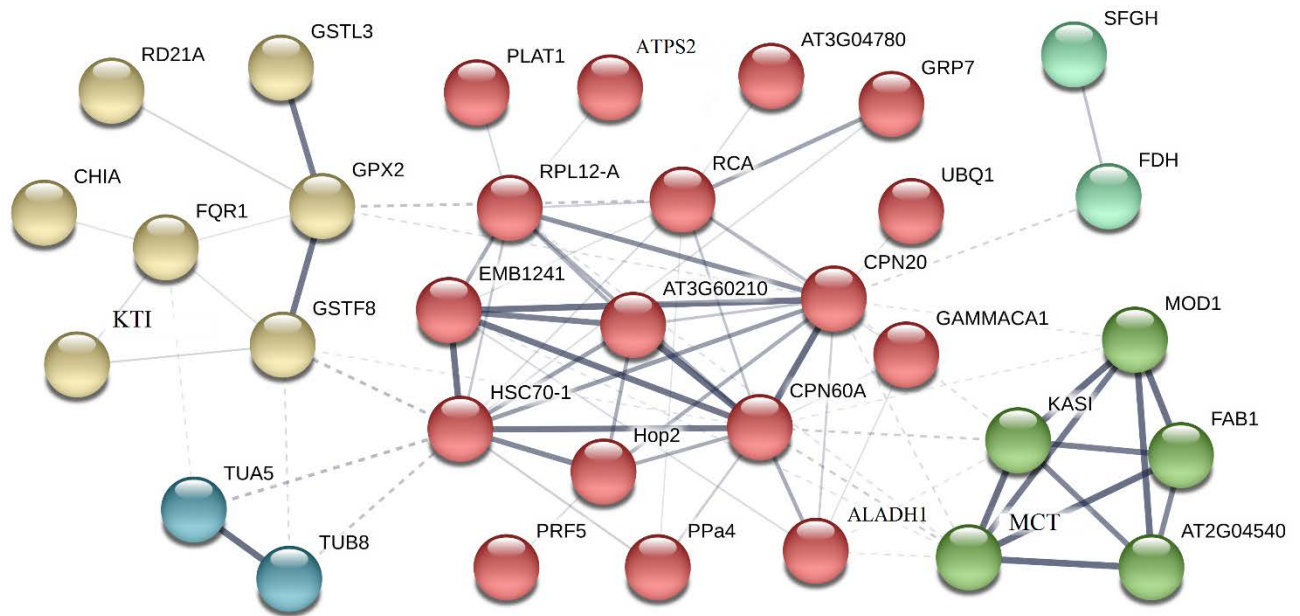


3.5. pav. 1, 2, 3 ir 6-os genų raiškos grupėms identifiukuotų biologinių procesų genų ontologijos terminų sąsajos semantinėje erdvėje ($\log_{10}p$ reikšmė) apibendrintos taikant REVIGO algoritmą

Apskritimų dydis yra proporcingas GO terminų dažniui, o spalva atitinka unikalumo kriterijų (>0,5 – mėlyna, >0,6 – žalia, >0,7 – geltona, >0,8 – raudona). Sutrumpinimas: a. – atsakas.

String duomenų bazėje nėra duomenų apie obels genus, todėl šio tyrimo proteomos analize identifiukuotų genų sąveikos interpretacijai pasitelkta analogija su *A. thaliana* genais (genų

sutrumpinti pavadinimai nurodyti 3.4. paveiksle kraštiniame dešiniajame stulpelyje) (žr. 3.6. pav.). Analogai nustatyti daugumai iš 49 identifikuotų žinomos funkcijos baltymų, išskyrus alergenui Pru av–1 giminingam baltymui, kurio geno numeris obels genomo duomenų bazėje yra MDP0000942516. Gali būti, kad toks Pru av–1 šeimai priklausantis baltymas nebūdingas *A. thaliana*.



3.6. pav. 1, 2, 3 ir 6-os genų raiškos grupių baltymams analogiškų *A. thaliana* genų sąsajų analizės rezultatai

Spalvos atinka funkcinis klasterius: geltona – oksidacinės – redukcinės pusiausvyros reguliacija susijusi su atsaku į stresą; raudona – baltymų metabolizmas ir jų funkcijos reguliacija; tamsiai žalia – riebiųjų rūgščių sintezė; šviesiai žalia – formato/formaldehido detoksofokacija susijusi su atsaku į stresą; mėlyna – ląstelės citoskeleto baltymai. Jungtys rodo sąsajas nustatytas eksperimentais, duomenų bazėse ir mokslinėje literatūroje, bendrais raiškos dėsniniais, lokalizacija genomuose. Jungčių storis yra proporcingas sąsajų patikimumo lygmeniui. Ištinės linijos rodo ryšius klasterių viduje, brūkšninės linijos – tarp klasterių.

Patikimų ryšių nenustatyta 8–iems genų analogams: cisteino prisotinto sekretuojamam baltymui (CAP), chorizmato mutazei 1 (CM1), enoilo–ACP reduktazei 1 (ENR1), panašaus į dominuojantį latekso baltymą 423 (MLP432), panašaus į noduliną 1 baltymui (NRP1), numanomam plastidžių lipidus surišančiam baltymui (PAP3), giminingam alergenui Pru av–1 (Pru av–1), bei aktyvaus tarpininko deaminazei (RidA), todėl šiuos baltymus koduojantys genai neparodyti sąveikos schemeje. Kitų genų sąveikos rezultatai atskleidė genų funkcijas, susijusias su oksidacinės–redukcinės pusiausvyros reguliacija bei formato detoksikacija (susijusia su atsaku į stresą), baltymų metabolizmu ir jų funkcijos reguliacija, riebiųjų rūgščių sinteze ir ląstelės citoskeleto formavimu (3.6. pav).

Šio tyrimo metu identifikuota keletas baltymų susijusių su oksidacinės–redukcinės pusiausvyros reguliacija, kuri susijusi su atsaku į stresą, tarp kurių RD21A raiška padidėjo

daugiausiai (~124,4 karto). Žinoma, kad šis baltymas dalyvauja biotinio ir abiotinio streso metu, ir padeda apsisaugoti nuo tam tikrų patogenų. Baltymai pasižymintys RD21A, aptinkami įvairiuose augaluose. Naujausi tyrimai parodė, kad RD21A yra svarbus augalo imuninio atsako komponentas, taip pat jis susijęs su įvairiu atsaku į biotinį ir abiotinį stresą [135;143]. Geriausiai ištirtas yra *A. thaliana* RD21A baltymas. Lampas su bendraautoriais nustatė, kad *A. thaliana* gali išgyventi streso metu, nes RD21A baltymas slopina streso ar patogeno aktyvuotą ląstelės mirtį [144].

Obels ląstelių sąveikos su *Bacillus* spp. kamienais Oa_4 ir Da_1 tyrimu identifikuota baltymų grupė, susijusi su baltymų metabolizmu ir jų funkcijos reguliacija. Šiai grupei priskirto PLAT1 baltymų kiekis padidėjo ~117 kartų. Baltymai, turintys PLAT (policistino, lipoksigenazės, alfatoksino ir triacilglicerolio lipazės) domeną, aptinkami įvairiuose augaluose, tačiau jų funkcija atsako į stresą metu mažai nagrinėta. Žinoma, kad šis baltymas dalyvauja ląstelių migracijos ir audinių reorganizacijos procesuose. Geriausiai ištirtas yra *A. thaliana* PLAT1 baltymas. T. K. Hyunas su bendraautoriais nustatė, kad abiotinio streso metu (įskaitant sausrą, šaltį, druskingumą) PLAT1 baltymo raiška stipriai padidėjo. Šis baltymas skatino baltažiedžio vairo augimą ir esant įprastoms sąlygoms [135]. Galimai, mūsų tyrimo metu po inkubacijos su *Bacillus* spp. Oa_4 kamienu obels ūgliuose stipriai padidėjusi PLAT1 baltymo raiška yra susijusi su obels audinių adaptacija *in vitro*. Taigi, obels ląstelėse identifikuotas PLAT1 baltymas funkcionuoja ne tik kaip streso reguliatorius, bet taip pat dalyvauja reguliuojant augalo augimą.

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad *Bacillus* spp. kamienų Oa_4 ir Da_1 obels ūglių augimą ir šakojimą slopinantis poveikis nėra suderinamas (t.y. ligą sukeliančios) augalo–patogeno sąveikos pasekmė, bet yra susijęs su augalo apsauginio atsako baltymų kaupimu audiniuose. Toks poveikis baltymų raiškai dar labiau išreikštas sumažinto apšvietimo sąlygomis. Apsauginio atsako formavimasis yra susijęs su augalo vystymosi programos reorganizaciją ir su energijos bei maistinių resursų perskirstymu, todėl sulėtėja augalo augimas ir yra aktyvuojami apsauginių baltymų, metabolitų sintezės. Šie pakitimai turi reikšmingą poveikį ir augalų fitohormonų pusiausvyrai, kuri reguliuoja vystymosi procesus. Todėl galima daryti prielaidą, kad obels ūglių augimo intensyvumo mažėjimas ir šakojimosi pakitimai yra susiję su tirtų endofitų kamienų aktyvinamais atsako į stresą procesais.

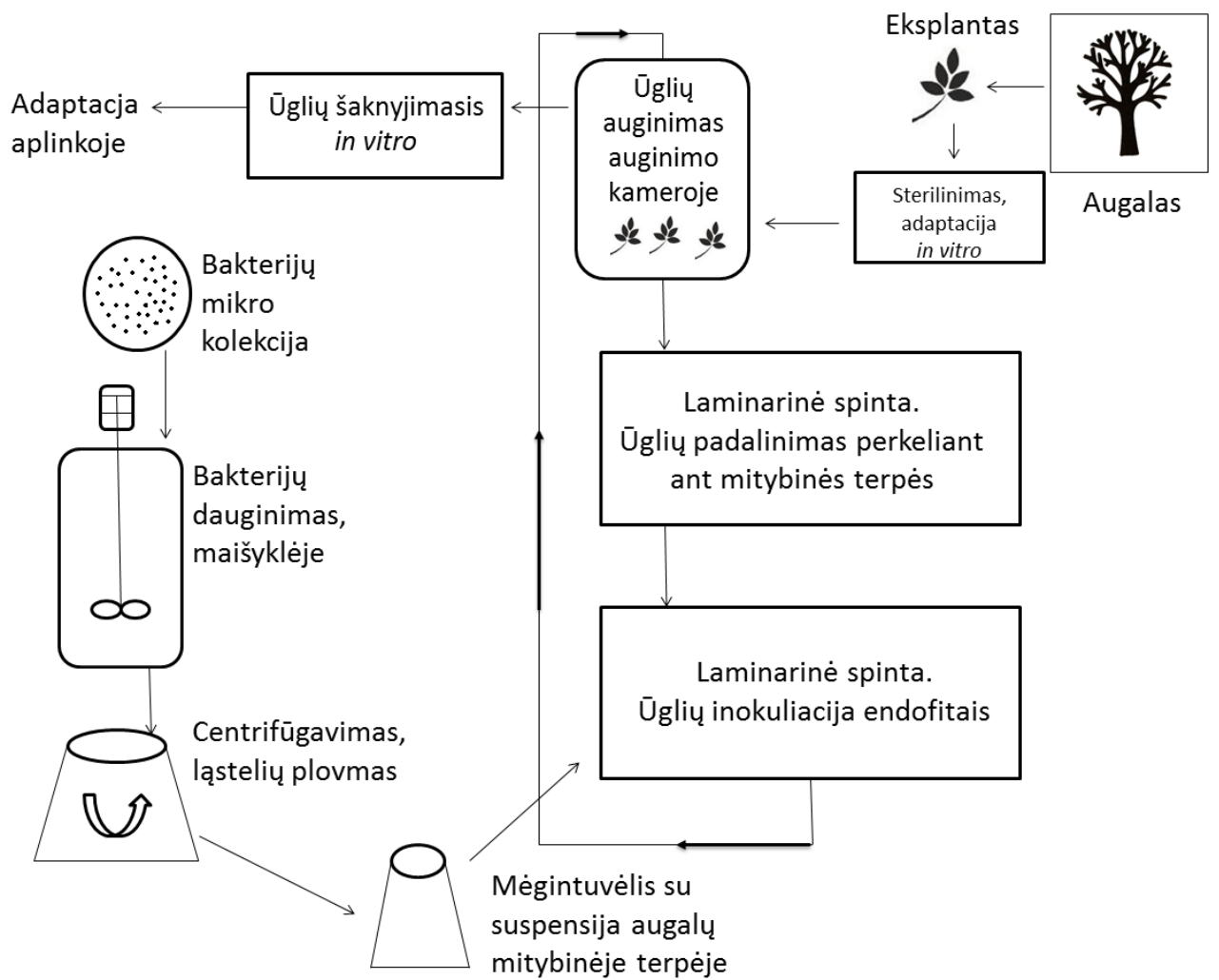
4. REKOMENDACIJOS

Tyrimo rezultatai rodo, kad augalų ir endofitų sąveikos pobūdis gali pasikeisti *in vitro* sąlygomis – tirti natūraliomis sąlygomis teigiamai augalo augimą veikiantys *Bacillus* spp. endofitinių bakterijų kamienai gali slopinti augalų augimą *in vitro* sąlygomis. Pramoniniam augalų dauginimui taikomos *in vitro* technologijų tobulinimui yra perspektyvus endofitinių mikroorganizmų panaudojimas, tačiau būtina įvertinti konkrečių bakterijų kamienų poveikį augalo vystymuisi.

Bacillus spp. endofitinių bakterijų kamienams nebūdinga suderinama sąveika su obels ūgliais *in vitro*, t.y. jie nėra patogeniški augalui, o galimas poveikio mechanizmas yra augalų streso atsako aktyvinimas. Tolimesniu tyrimu būtų tikslinga išsamiau įvertinti augalų streso atsako rodiklius, tokius kaip ADJ gamyba, fitohormonų kiekio pokyčius.

Norint pramoniniu būdu augalus dauginti *in vitro* ir jų dauginimui pritaikyti endofitus rekomenduojama laikytis principinės šio proceso schemos (4.1. pav.). Pirmiausia surenkami norimo dauginimo augalo eksplantai. Jie sterilizuojami ir adaptuojami *in vitro* sąlygomis. Sterilizuoti augalo ūgliai patalpinami auginimo kameroje ir rekomenduojama auginti 16 valandų. Po auginimo, rekomenduojama laminarinėje spintoje atskirti ūglius ir perkelti ant maitinamosios terpės bei auginti apie parą. Praėjus parai laiko, rekomenduojama ūglius inokuliuoti pasirinktais endofitais ir vėl juos patalpinti auginimo kameroje. Šį procesą rekomenduojama kartoti kas 30 dienų. Po inokuliavimo endofitais, stebimas ūglių išsisknyjimas ir adaptacija aplinkoje.

Pasirinkus norimus inokuliacijai endofitus, jie paimami iš mikroorganizmų kolekcijos ir dauginami specialioje terpėje, maišyklėje. Rekomenduojama bakterijas auginti apie parą laiko. Po dauginimo, bakterijų suspensija plaunama ir centrifuguojama. Gauta suspensija perkeliama į kitą mėgintuvėlį su augalų mitybine terpe ir inokuliuojami dauginami augalai.



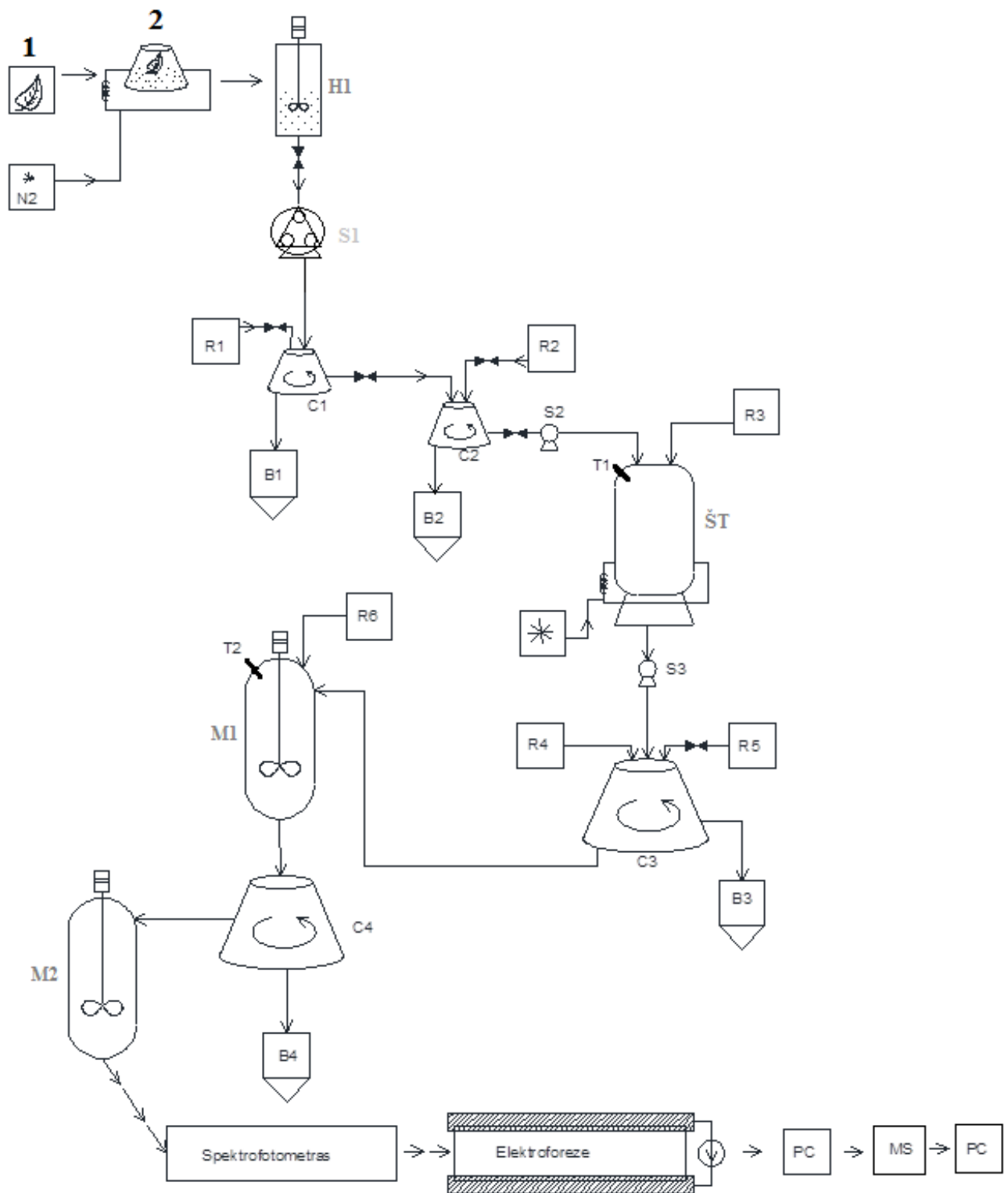
4.1. pav. Rekomenduojama endofitų taikymo augalo reguliacijai pramoninio augalų dauginimo *in vitro* proceso schema

Norint gryninti baltymus iš augalų pramoniniu būdu, rekomenduojama laikytis sudarytos principinės aparatūrinės schemos (4.2. pav.).

Pirmiausia surenkama žaliava į talpą nr. **1**. Į žaliavą pridedama metalinių šratų, ir skystu N₂ atšaldoma talpoje nr. **2**. Paruošta žaliava homogenizuojama homogenizatoriuje **H1**. Ant homogenato pilamas buferis iš rezervuaro **R1** ir centrifūguojama centrifūgoje **C1**. Susidariusios nuosėdos pašalinamos kaip atliekos talpoje **B1**. Ant likusių gryninamų baltymų pilamas buferis iš rezervuaro **R2** ir centrifūguojama centrifūgoje **C2**. Po centrifūgavimo susidariusios nuosėdos pašalinamos į talpą **B2**. Ant gauto baltymų mišinio pilamas amonio acetatas iš rezervuaro **R3** ir išcentrinu siurbliu **S2** mišinys tiekiamas į šaldymo talpą **ŠT**. Joje gryninamus baltymus rekomenduojama laikyti 16 val, esant –20 °C temperatūrai (**T1**). Po inkubacijos šaldymo talpoje, gryninami baltymai plaunami metanolio ir acetonu tiekiamais iš rezervuarų **R4** ir **R5**. Panaudotos medžiagos plovimui pašalinamos kaip atliekos talpoje **B3**, o likę baltymai džiovinami ir pridedama elektroforezės buferio bei centrifūguojama centrifūgoje **C3**. Po centrifūgavimo, rekomenduojama gryninamus baltymus inkubuoti 1 val., palaikant 25 °C temperatūra (**T2**) maišyklėje **M1**. Po inkubacijos mėginiai perkeliama į naują indą ir centrifūguojama centrifūga **C4**. Nereikalingas skystis pašalinamas į talpą **B4**, o likusi dalis ruošama optinio tankio matavimui ir maišoma maišyklėje **M2**. Spektrofotometru matuojamas optinis tankis, vėliau atliekama dvikryptė elektroforezė. Gauti duomenys analizuojami kompiuteryje. Vėliau atlikta masių spektrometrija ir duomenys vėl analizuojami kompiuteriu.

4.1. lentelė. Baltymų gryninimo gamybos principinės aparatūrinės schemos įrenginių žymėjimas

Žymėjimas	Įrenginys
H1	Homogenizatorius
S1– S2– S3	Siurblys
S3	Trečias siurblys
C1–C2–C3–C4	Centrifūga
C2	Antra centrifūga
C3	Trečia centrifūga
C4	Ketvirta centrifūga
R1–R2–R3–R4–R5–R6	Rezervuaras
B1–B2–B3–B4	Atliekos
T1–T2	Pirmas termometras
ŠT	Šaldymo talpa
M1–M2	Pirma maišyklė



4.2. pav. Rekomenduojama baltymų gryninimo gamybos aparatūrinė schema

IŠVADOS

1. Įvertinus endofitinių *Bacillus* spp. kamienų Oa_4 ir Da_1 poveikį naminės obels ūgliams *in vitro* sąlygomis, nustatyta, kad nepriklausomai nuo apšvietimo sąlygų abu kamienai panašiai slopina ūglių augimą (nuo 3,4 iki 4,4 kartų) ir pridėtinių ūglių formavimąsi (nuo 2,7 iki 3,6 kartų). Po inkubacijos su endofitinėmis bakterijomis ūgliams morfologinių pažeidimų nenustatyta, todėl ūglių augimo slopinimas nėra patogenezės pasekmė.
2. Obels ūglių proteomos tyrimu nustatyta, kad inkubacija su endofitiniais *Bacillus* spp. kamienais Oa_4 ir Da_1 daugiausiai lemia baltymų kiekio didėjimą (109 iš 111 patikimų skirtumų) ir didesnis poveikis baltymų raiškai nustatytas sumažinto apšvietimo sąlygomis. Didesnį poveikį ūglių baltymų raiškai turėjo inkubacija su *Bacillus* sp. kamieniu Oa_4.
3. Įvertintus ląstelės biologinius procesus ir genų funkcijas susijusias su endofitinių bakterijų poveikiu naminės obels ūgliams *in vitro* nustatyta, kad inkubacija su *Bacillus* spp. bakterijų kamienais Oa_4 ir Da_1 lemia oksidacijos–redukcijos, apsauginio atsako, baltymų metabolizmo bei jų funkcijos reguliacijos, ląstelės organizacijos ir lipidų metabolizmo procesų pokyčius obels ūglių ląstelėse.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. SHULAEV, V. et al. Multiple models for *Rosaceae* genomics. *Plant Physiol.* 2008, 147 (3), 985–1003.
2. NHUT D. T., N. T. HAI, and M. X. PHAN. A highly efficient protocol for micropropagation of *Begonia tuberosus*. *ResearchGate*. 2010, 589. Prieiga per: DOI 10.1007/978-1-60327-114-1_2.
3. FIGUEIREDO, J. E. F. et al. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009, 40, 522–534. ISSN 1517–8382.
4. Herman E.B. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities. 1990, 233–238.
5. CASTRO-SOWINSKI, S., Y. HERSCHKOVITZ, and E. JURKEVITCH. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *Microbiology Letters*. 2007, 276 (1). Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00878.x>
6. ADHIKARI, T. B. et al. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Canadian Journal of Microbiology*. 2001, 47, 916–924.
7. VELASCO, R. et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature genetics*. 2010, 42 (10), 833–841. Prieiga per: doi:10.1038/ng.654.
8. POTTER, D. et al. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*. 2007. Prieiga per : doi:10.1007/s00606-007-0539-9.
9. DIRLEWANGER, E. et al. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet*. 2002, 105, 127–138.
10. BHATTI, S. and G. JHA. Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. *Plant Cell Reports*. 2010. Prieiga per: doi:10.1007/s00299-010-0907-8
11. NOUR, V., I. TRANDAFIR, and M. E. IONICA. Compositional characteristics of fruits of several apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*. 2010. Prieiga per: doi:10.15835/nbha3834762
12. WALIA, M., T. S. MANN, D. KUMAR, V. K. AGNIHOTRI, and B. SINGH. Chemical composition and *in vitro* cytotoxic activity of essential oil of leaves of *Malus domestica* Growing in Western Himalaya (India). *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2012. Prieiga per: doi:10.1155/2012/649727
13. FORSLINE, P. L., H. S. ALDWINCKLE, E. E. DICKSON, J. J. LUBY, and S. C. HOKANSON. Collection, Maintenance, Characterization, and Utilization of Wild Apples of Central Asia. 2003, 29. ISBN 0-471-21968-1.
14. COART, E., S. VAN GLABEKE, M. DE LOOSE, A. S. LARSEN, and I. ROLAND-RUIZ. Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology*. 2006. Prieiga per: doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02924.x
15. HARRIS, S., J. ROBINSON, and B. JUNIPER. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends Genetic*. 2002, 18 (8), 426–430.
16. TATUM, T. C., S. STEPANOVIC, D. P. BIRADAR, A. L. RAYBURN, and S. S. KORBAN. Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples. *Genome*. 2005, 48, 924–930. Prieiga per: doi.org/10.1139/g05-033
17. PATERSON, A. H. et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*. 2009, 457, 551–556. Prieiga per: doi:10.1038/nature07723
18. MUELLER, L. A. et al. A Snapshot of the Emerging Tomato Genome Sequence. *Plant Genome*. 2009, 2, 78–92. Prieiga per: doi:10.3835/plantgenome2008.08.0005

19. ALDWINCKLE, H. and MALNOY M. Global Science Books Plant Regeneration and Transformation in the Rosaceae. *Transgenic Plant Journal*. 2009, 1, 1–39.
20. ZIMMERMAN, R. H., and P. C. DEBERGH. Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic; 1991, 231–46.
21. HARTMANN, H. T., D. E. KASTER, F. T. DAVIES, and R. L. GENEVE. Plant propagation: Principles and Practices. In Anthony V. *Cell and Tissue Culture Propagation*. 2004, 644–699.
22. DOBRÁNSZKI, J., J. A. TEIXEIRA, and D. SILVA. Micropropagation of apple — A review. *Biotechnol*. 2010, 28, 462–488. Prieiga per: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.008
23. WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 2012, 11(76), 14025–14035. Prieiga per: DOI: 10.5897/AJB12.1693. ISSN 1684–5315
24. MAHNA, N. and AZAR A. M. *In vitro* micropropagation of apple (*Malus × domestica* Borkh.) cv. golden delicious. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 2007, 72 (1).
25. GHANBARI, A. Impacts of plant growth regulators and culture media on *in vitro* propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. *Iran. J. Genet. PLANT Breed*. 2014, 3(1).
26. Birch R. G. Plant Transformation: Problems and Strategies for Practical Application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997, 48, 297–326.
27. PENCE, V.C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cell*. 2010, 47, 176–187.
28. RAMAGE, C.M., and R. R. WILLIAMS. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. *J Exp Bot*. 2002, 53, 1437–1443.
29. KUMAWAT, S., S. KACHHWAHA, and S. LAL KOTHARI. Micronutrient optimization in the basal medium improves *in vitro* plant regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). *Propag Ornament Plants*. 2013, 13, 3–11.
30. SEN, A. Oxidative stress studies in plant tissue culture. *Intech*. 2012, 3.
31. BENSON, E. E., and K. A. ROUBELAKIS–ANGELAKIS. Oxidative stress in recalcitrant tissue cultures of grapevine. *Free Radic Biol Med*. 1994, 16(3), 355–362.
32. CASSELLS, A. C., and R. F. CURRY. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001. Prieiga per: doi:10.1023/A:1010692104861.
33. ROJAS–MARTINEZ, L., R. G. F. VISSER, and G. J. DE KLERK. The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propag Ornament Plants*. 2010, 10, 169–175.
34. SAHER, S., A. PIQUERAS, E. HELLIN, and E. OLMOS. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: The role of oxidative stress. *Physiol. Plant*. 2004. Prieiga per: doi:10.1111/j.0031–9317.2004.0219.x
35. KEVERS, C., T. FRANCK, R. J. STRASSER, J. DOMMES, and T. GASPAR. Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress induced change of physiological state. *Plant Cell Tiss Org*. 2004, 77, 181–191.
36. SCHULZ, B., and C. BOYLE. What are endophytes? *Microbial root endophytes*. 2006, 1–13. Prieiga per: http://dx.doi.org/10.1007/3–540–33526–9_1
37. MILIUTE, I., O. BUZAITI, D. BANIULIS, and V. STANYS. Bakterinių endofitų reikšmė žemės ūkio augalų atsparumui stresui: Apžvalga. *Zemdirbyste*. 2015. Prieiga per: doi:10.13080/z–a.2015.102.060
38. RYAN, R. P., K. GERMAINE, A. FRANKS, D. J. RYAN, and D. N. DOWLING. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*. 2008, 278 (1), 1–9. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574–6968.2007.00918.x>

39. HAMILTON, C. E., P. E. GUNDEL, M. HELANDER, and K. SAIKKONEN. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity*. 2012, 54 (1), 1–10. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-012-0158-9>
40. GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012, 1–15. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
41. RAAIJMAKERS, J. M., and MAZZOLA M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2012, 50, 403–424. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
42. CHRISTINA, A., V. CHRISTAPHER, and S. J. BHOORE. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. *Pharmacognosy Reviews*. 2013, 7 (13), 11–16.
43. BRADER, G., S. COMPANT, B. MITTER, F. TROGNITZ, and A. SESSITSCH. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 27, 30–37. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.012>
44. WANG, M., Y. XING, J. WANG, Y. XU, and G. WANG. The role of the *chiI* gene from the endophytic bacteria *Serratia proteamaculans* 336x in the biological control of wheat takeall. *Canadian Journal of Microbiology*. 2014, 60 (8), 533–540. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2014-0212>
45. PIETERSE, C. M. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 2014, 52, 347–375. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
46. HALLMAN, J., A. QUADT-HALLMANN, W. F. MAHAFFEE, and J. W. KLOEPPER. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*. 1997, 43, 895–914.
47. KUKLINSKY-SOBRAAL, K. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*. 2004, 6, 1244–1251. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x>
48. ROSENBLUETH, M., and E. MARTINEZ-ROMERO. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 2006, 19 (8), 827–837. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
49. LODEWYCKX, C., M. MERGEAY, J. VANGRONSVELD, H. CLIJSTERS, and D. VAN DER LELIE. Isolation, characterization, and identification of bacteria associated with the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *International Journal of Phytoremediation*. 2002, 4 (2), 101–115. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1080/15226510208500076>
50. MUNDT, J. O., and N. F. HINKLE. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*. 1976, 32 (5), 694–698.
51. SEGHERS, D., L. WITTEBOLLE, E. M. TOP, W. VERSTRAETE, and S. D. SICILIANO. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70 (3), 1475–1482. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.3.1475-1482.2004>
52. SOUZA, S. A. et al. Endophytic bacterial diversity in banana ‘Prata Ana’ (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*. 2013, 36 (2), 252–264. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572013000200016>
53. KOBAYASHI, D. Y., and J. D. PALUMBO. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *Microbial endophytes*. 2000, 199–233.
54. GUPTA, C., R. DUBEY, and D. MAHESHWARI. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*. 2002, 35, 399–405. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-002-0486-0>
55. BACON, C. W., and D. M. HINTON. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. *Plant-associated bacteria*. 2007, 155–194.

56. JACOBS, M. J., W. M. BUGBEE, and D. A. GABRIELSON. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*. 1985, 63, 1262–1265. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1139/b85-174>
57. MISAGHI, I. J., and C. R. DONNDELINGER. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology Journal*. 1990, 80, 808–811. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-80-808>
58. CHI, F. et al. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71 (11), 7271–7278. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.11.7271-7278.2005>
59. SMITH, K. P., and R. M. GOODMAN. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 1999, 37, 473–491. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.473>
60. ABBAMONDI, G. R., et al. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016, 3(1). Prieiga per: doi:10.1186/s40538-015-0051-3
61. DE WIT, P. J. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, 64, 2726–2732.
62. HOU, S., Y. YANG, and J. M. ZHOU. The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen. *Plant Signal. Behav.* 2009, 4, 283–293.
63. ORTIZ-CASTRO, R., H. A. CONTRERAS-CORNEJO, L. MACIAS-RODRIGUEZ, and J. LOPEZ-BUCIO. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 2009, 4, 701–712.
64. STASKAWICZ, B. First insights into the genes that control plant-bacterial interactions. *Mol. Plant Pathol.* 2009, 10, 719–720.
65. DEN HERDER, G. and M. PARNISKE. The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, 12, 491–499.
66. GIBSON, K. E., H. KOBAYASHI, and G. C. WALKER. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* 2008, 42, 413–441.
67. MASSON-BOIVIN, C., E. GIRAUD, X. PERRET, and J. BATUT. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.* 2009, 17, 458–466.
68. MARTINEZ-ROMERO, E. Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol.* 2009, 28, 361–370.
69. PIRTTILÄ, A. M., H. LAUKKANEN, H. POSPIECH, R. MYLLYLÄ, and A. HOHTOLA. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66, 3073–3077. Prieiga per: doi:0099-2240/00
70. GEORGE, E. F., M. A. HALL, and G. J. DE KLERK. Plant propagation by tissue culture. *Springer, Dordrecht*. 2008.
71. DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009, 25, 189–195. Prieiga per: doi:10.1007/s11274-008-9878-0
72. ABREU-TARAZI, M. F. et al. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010, 26, 555–560. Prieiga per: DOI 10.1007/s11274-009-0191-3.
73. WEBER, O. B. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil.* 1999, 210, 103–113. Prieiga per: doi:10.1023/A:1004623523179
74. WEBER, O. B. et al. Effect of diazotrophic bacterium inoculation and organic fertilization on yield of Champaka pineapple intercropped with irrigated sapota. *Plant Soil.* 2009. Prieiga per: doi:10.1007/s11104-009-0059-1

75. BARKA, E. A., A. BELARBI, C. HACHET, J. NOWAK, and J. C. AUDRAN. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. Prieiga per: doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09087.x
76. LONG, R. D., T. F. CURIIN, and A. C. CASSELLS. An investigation into the effects of bacterial contaminants on puiato nodal cultures. *Acta Hon.* 1988, 225, 83–91.
77. SMITH, M. T. et al. Use of ‘Omic’ technologies to study humans exposed to benzene. *Chem Biol Interact.* 2005, 153–154.
78. SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001, 409(6822), 928–33.
79. VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001, 291(5507), 1304–51.
80. VLAANDEREN, J. et al. Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med.* 2010, 67(2), 136–143. Prieiga per: doi:10.1136/oem.2008.042788
81. Culver
82. JOYCE, A. R., and B. O. PALSSON. The model organism as a system: integrating ‘omics’ data sets. *Nature.* 2006, 7. Prieiga per: doi:10.1038/nrm1857
83. KELLNER, R. Proteomics. Concepts and perspectives. *Springer-Verlag.* 2000, 366, 517–524.
84. ISHII, N., and M. TOMITA. Multi-omics data-driven systems biology of *E. coli*. In *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli.* Springer. 2009, 41–57.
85. ZHANG, W., F. LI, and L. NIE. Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: Application and methodologies. *Microbiology.* 2010. Prieiga per: doi:10.1099/mic.0.034793-0
86. URANO, K., Y. KURIHARA, M. SEKI, and K. SHINOZAKI. ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology.* 2010, 13(2), 132–138.
87. YUAN, J. S., D. W. GALBRAITH, S. Y. DAI, P. GRIFFIN, and C. N. STEWART. Plant systems biology comes of age. *Trends Plant Sci.* 2008, 13, 165–171.
88. GRAHAM, R. L. J., C. GRAHAM, and G. MCMULLAN. Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microb Cell Fact.* 2007, 6.
89. WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 2013, 13(1), 19–50. ISSN: 0264-8725. Prieiga per: DOI:10.1080/02648725.1996.10647923
90. WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by twodimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology.* 1996, 14, 61–65.
91. JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Rev Biophys.* 1997, 30, 279–333.
92. GEVAERT, K., and J. È. L VANDEKERCKHOVE. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis.* 2000, 21, 1145–1154.
93. EFRAT, A., F. HOFFMANN, K. KRIEGEL, C. SCHULTZ, and C. WENK. Geometric algorithms for the analysis of 2D-electrophoresis gels. 2001.
94. LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2007, 190–202. Prieiga per: doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.049
95. CANDIANO, G. et al. 2D-electrophoresis and the urine proteome map: Where do we stand? *Journal of Proteomics.* 2010, 73, 829–844. Prieiga per: doi:10.1016/j.jprot.2009.12.003
96. DOS REMEDIOS, C. G. et al. Genomics, proteomics and bioinformatics of human heart failure. *J Muscle Res Cell Motil.* 2003, 24(4–6), 251–260.

97. PENNINGTON, S. R., M. R. WILKINS, D. F. HOCHSTRASSER, and M. J. DUNN. Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends in Cell Biology*. 1997, 7, 168–173.
98. BHATNAGAR, D. et al. The ‘omics’ tools: genomics, proteomics, metabolomics and their potential for solving the aflatoxin contamination problem. *World Mycotoxin J.* 2008, 1(1), 3–12. Prieiga per: doi:10.3920/WMJ2008.x001
99. GÖRG, A., W. WEISS, and M. J. DUNN. Current two–dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004, 4, 3665–3685. Prieiga per: doi:10.1002/pmic.200401031
100. O’FARRELL, P. H. High resolution two–dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975, 250, 4007–4021.
101. SONCK, K. A. et al. The proteome of *Salmonella typhimurium* grown under in vivo–mimicking conditions. *Proteomics*. 2009, 9, 565–579.
102. http://www.bio.iitb.ac.in/~sanjeeva/virtual_lab/Virtual_Laboratory/theory_only.html
103. WILLIAM, C. S. CHO. Proteomics technologies and challenges. *Geno. Prot. Bioinfo*. 2007, 5 (2), 77–85.
104. VALDÉS, A., C. SIMÓ, C. IBÁÑEZ, and V. GARCÍA–CAÑAS. Profiling of genetically modified organisms using omics technologies. *Compr. Anal. Chem.* 2014. Prieiga per: doi:10.1016/B978–0–444–62650–9.00013–0
105. MURASHIGE, T., and F. A. A. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962, 15, 473–497.
106. LERY, L. M. S. et al. Quantitative Proteomic Analysis of the Interaction Between the Endophytic Plant–Growth–Promoting Bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 2011, 24 (5), 562–576. Prieiga per: doi:10.1094/MPMI–08–10–0178
107. ISAACSON, T. et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc*. 2006, 1(2), 769–774.
108. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 7(72), 248–254.
109. SHEVCHENKO, A., H. THOMAS, J. HAVLIS, J. OLSEN, and M. MANN. In–gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2006, 1(6), 2856–2860.
110. CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 2005, 21 (18), 3674–3676.
111. PESQUITA, C., D. FARIA, A. O. FALCAO, P. LORD, and F. M. COUTO. Semantic similarity in biomedical ontologies. *PLoS Comput Biol*. 2009, 5(7).
112. SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015, 43: D447–D452.
113. James k
114. STURZ, A. V., B. R. CHRISTIE, and J. NOWAK. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000, 19, 1–30. Prieiga per: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735–2689\(01\)80001–0](http://dx.doi.org/10.1016/S0735–2689(01)80001–0)
115. TAGHAVI, S. et al. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol*. 2009, 75(3), 748–757. Prieiga per: doi:10.1128/AEM.02239–08
116. FERNANDEZ, O. et al. *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. *Molecular Plant Microbe Interactions Journal*. 2012, 25 (4), 496–504. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI–09–11–0245>
117. NAVEED, M., M. B. HUSSAIN, Z. A. ZAHIR, B. MITTER, and A. SESSITSCH. Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain

PsJN. *Plant Growth Regulation*. 2014, 73, 121–131. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-013-9874-8>

118. LAURA C. Roden and Robert A. Ingle. Lights, Rhythms, Infection: The Role of Light and the Circadian Clock in Determining the Outcome of Plant–Pathogen Interactions. *Plant Cell*. 2009, 21 (9), 2546–2552.

119. KLOEPPER, J. W., C. M. RYU, and S. ZHANG. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 2004a, 94, 1259–66.

120. PINCHUK, I. V., P. BRESSOLLIER, I. B. SOROKULOVA, B. VERNEUIL, and M. C. URDACI. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res Microbiol*. 2002, 153, 269–76.

121. CHOUDHARY, D. K., and B. N. JOHRI. Interactions of *Bacillus* spp. And plant – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 2009, 164, 493–513.

122. PRIEST, F. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, biochemistry, physiology, and molecular genetics. Washington: ASM Press; 1993, 3–16.

123. BEAUREGARD, P. B., Y. CHAI, H. VLAMAKIS, R. LOSICK, and R. KOLTER. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2013. Prieiga per: doi:10.1073/pnas.1218984110

124. ARKHIPOVA, T. N., S. U. VESELOV, A. I. MELENTIEV, E. V. MARTINENKO, and G. R. KUDOYAROVA. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil*. 2005, 272(1–2), 201–209.

125. DONG, Y. H., J. L. XU, X. Z. LI and L. H. ZHANG. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, 97(7), 3526–3531.

126. BAIS, H. P., R. FALL, and J. M. VIVANCO. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol*. 2004, 134(1), 307–319.

127. SHUAI W. et al. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. *J Microbiol Biotechnol*. 2009, 19 (10), 1250–1258.

128. CHOUDHARY, D. K, and B. N. JOHRI. Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res*. 2009, 164 (5), 493–513.

129. TAMOŠIŪNĖ INGA. Naminės obels filozofijos endofitinių bakterijų populiacijos sudėties ir sąveika su obels ląstelėmis ir ūgliais *in vitro*. Mokslo daktaro disertacija. 2017.

130. HEAZLEWOOD, J. L. et al. Experimental Analysis of the *Arabidopsis* Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins. *PLANT CELL ONLINE*. 2004.

Prieiga per: doi:10.1105/tpc.016055

131. TIMMUSK S., and E. G. H. WAGNER. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. 1999, 12 (11), 951–959.

132. KANDASAMY, S. et al. Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. *Proteome Sci*. 2009, 7, 47.

133. SHINDO, T., J. C. MISAS-VILLAMIL, A. C. HÖRGER, J. SONG, and R. A. L. VAN DER HOORN. A role in immunity for *Arabidopsis* cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLoS One*. 2012. Prieiga per: doi:10.1371/journal.pone.0029317

134. DAUGAARD, M., M. ROHDE and M. JAATTELA. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. 2007, 3702–3710.

135. HYUN, T. K. et al. The *Arabidopsis* PLAT domain protein1 is critically involved in abiotic stress tolerance. *PLoS One*. 2014, 9 (11), 112946.
136. LU, B. et al. Novel function of PITH domain-containing 1 as an activator of internal ribosomal entry site to enhance RUNX1 expression and promote megakaryocyte differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015, 72, 821. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1704-2>
137. DU, C., M. FANG, Y. LI, L. LI, and X. WANG. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000, 102 (1), 33–42. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00008-8)
138. LAPPARTIENT A. G., and B. TOURAINÉ. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO₄²⁻ uptake in intact canola. 1996.
139. WOOD G.E., A.K. HAYDOCK, and J. A. LEIGH. Function and regulation of the formate dehydrogenase genes of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of bacteriology*. 2002.
140. BOLLER, T., A. GEHRI, F. MAUCH and U. VOGELI. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene purification, properties, and possible function. *Planta*. 1983, 157 (1), 22–31.
141. ROBERT, A., and G.HARDLY. Clinical and nutritional benefits of cysteine-enriched protein supplements. 2011, 14 (6), 562–568. Prieiga per: doi: 10.1097/MCO.0b013e32834c1780
142. BREHELIN, C., F. KESSLER, and K.J. VAN WIJK. Plastoglobules : versatile lipoprotein particles in plastids. *Cell*. 2007, 12 (6), 260–266. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.003>
143. GU, C. et al. Post-translation regulation and trafficking of the granulin-containing protease RD21A of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 2012, 7 (3), 3242–32422. Prieiga per: 10.1371/journal.pone.0032422. ISSN: 19326203.
144. LAMPL, N., N. ALKAN, O. DAVYDOV, and R. FLUHR. Set-point control of RD21 protease activity by AtSerp1 controls cell death in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2013. Prieiga per: doi:10.1111/tbj.12141