

**В.А. Циганкова¹, Я.В. Андрусевич¹, Л.О. Білявська², В.Є. Козирицька Г.О.²,
Г.О. Іутинська², А.П.Галкін³, Т.О.Галаган⁴, О.В.Болтовська⁴**

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
вул. Мурманська, 1, Київ, 02094

²Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Д03680, ДСП, вул. Заболотного, 154, Київ

³Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123

⁴Інститут захисту рослин НААН України,
вул. Васильківська, 33, Київ, 03022

РІСТСТИМУЮЧІ, ФУНГІЦИДНІ І НЕМАТИЦИДНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ СУБСТАНЦІЙ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ ТА ЇХ ВПЛИВ НА СИНТЕЗ МАЛИХ si/mi РНК В КЛІТИНАХ РОСЛИН

Нові субстанції на основі метаболітів ґрунтових стрептоміцетів, а також композиції препарату аверком з елісаторами виявляють рістрегулюючу активність та біозахисні властивості, підтверджені в дослідках на пшениці ярії сорту Грізо і на огірках сорту Ніжинський. Більшість створених субстанцій показують антагоністичну дію щодо фітопатогенних грибів, а також нематодозну активність до голової нематоди *Meloidiidae incognita*. За умов штучного інфікування нематодами препарат аверком та його модифікації виявляють 85-100 %-ий захисний ефект на проростки огірка сорту Ніжинський. Методом ДОТ-блот гібридизації встановлено значні різниці у показнику відсотка гомології між малими регуляторними РНК (si/mi РНК) та мРНК дослідних (оброблених субстанціями на інфекційному фоні) і контрольних рослин огірки та пшениці. Обговорена роль si/miРНК у підвищенні резистентності рослин до патогенних та паразитичних організмів за умов застосування створених субстанцій.

Ключові слова: стрептоміцети, фітопатогенні гриби, нематоди, рослини, малі регуляторні РНК (si/miРНК).

За останні роки значно збільшився спектр хвороб основних сільськогосподарських культур порівняно з 90-ми роками ХХ століття. Фітопатогени, окрім зниження кількості і якості врожаю, призводять до накопичення в рослинній продукції токсинів, небезпечних для здоров'я людини і тварин [6]. Незважаючи на появу нових хімічних препаратів, загальна ситуація принципово не змінюється: хвороби часто-густо носять епідемічний характер, крім того ми є свідками не тільки збільшення шкодочинності відомих патогенів, але й появи нових небезпечних видів, часто з переліку карантинних об'єктів. Погіршуються харчові, кормові та технологічні властивості товарної продукції, посівна якість насіння. Має місце розвиток як бактеріозів, так і змішаних інфекцій, викликаних декількома збудниками. Відомо також, що значні втрати врожаю овочів, особливо в закритому ґрунті,носять ґрунтові фітогельмінти – нематоди. Кількість уражених нематодозами рослин може досягати 100 %, і протягом 2-х місяців після висадки розсади овочів розвиток інвазійного процесу призводить до загибелі рослин. За даними ФАО, недобори врожаю від патогенів і шкідників коливаються від 15-20 до 40-50 % [2].

Інтенсивне використання хімічних засобів захисту рослин викликає ряд негативних наслідків: зниження родючості ґрунту, забруднення навколишнього середовища і рослинної продукції залишками хімікатів, формування стійких рас збудників хвороб, збіднення кількісного і якісного складу природних мікробних ценозів, в основному, за рахунок зменшення чисельності корисних членів мікробіоти [1]. В сільському господарстві постійно зростає інтерес до отримання продукції без використання пестицидів, із застосуванням екологічно збалансованих агротехнологій, в яких важливе місце посідають мікробні препарати [3, 5, 15].

Важливу роль у покращенні фітосанітарного стану ґрунту та підвищенні стійкості рослин до фітопатогенів відіграють ґрунтові мікроорганізми, а саме представники роду *Streptomyces*. Створені на основі стрептоміцетів препарати є перспективною складовою інтегрованої системи захисту сільськогосподарських культур [2]. В останні десятиліття в практику сільського господарства впроваджуються препарати на основі макролідного антибіотика авермектину –

продукту метаболізму ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis*. На основі авермектину створено ряд препаратів, які використовують як біопестициди для регуляції чисельності екзо- і ендопаразитів рослин, у тому числі і нематод [15].

У проведених нами молекулярно-генетичних дослідженнях [8] показано, що нові вітчизняні полікомпонентні регулятори росту рослин природного походження, до складу яких входять авермектини, значно підвищують стійкість рослин до різних патогенних та паразитичних організмів завдяки стимуляції ними синтезу в клітинах малих регуляторних si/miPHK (small interfering RNA – siRNA та microRNA - miRNA), які відіграють важливу роль в резистентності рослин до різноманітних шкідників. Дослідження впливу нових біологічних препаратів на геном рослин, у тому числі на синтез si/miPHK у наш час є актуальним.

Співробітники Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України селекціонували штам стрептоміцету *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179, здатний до синтезу авермектинів, на основі якого створено вітчизняний препарат – аверком із високою нематодцидною та рістстимулюючою дією [2]. До складу аверкому окрім авермектину входить широкий комплекс біологічно активних сполук: амінокислоти, вітаміни, ліпіди, жирні кислоти, фітогормони. Ці речовини впливають на ростові процеси рослин, індукують стійкість до захворювань і підвищують врожайність [2,15].

Зважаючи на те, що нагальною потребою сучасного рослинництва є розробка системи біологічного захисту рослин від змішаних інфекцій (бактеріозів + мікозів + нематодозів), особливої актуальності набуває питання розробки поліфункціональних препаратів на основі метаболітів *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 і пошук нових перспективних штамів.

Метою цієї роботи було вивчення антигрибкової і антинематодної дії нових композиційних субстанцій на основі метаболітів *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 та інших ґрунтових стрептоміцетів, а також дослідження їхнього впливу на зміни пулу малих регуляторних si/miPHK в клітинах рослин за умов біотичних стресів, викликаних грибовими або нематодними ураженнями.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були:

– штам *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 з колекції відділу загальної і ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ і комплексний препарат аверком, отриманий етанольною екстракцією з міцелію 7-добової культури продуцента;

– стрептоміцети-антагоністи фітопатогенних мікроорганізмів з колекції відділу загальної і ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ: *S. marinolimosus* УКМ Ас-2186, *S. cremeospinus* УКМ Ас-2187, *S. violans* УКМ Ас-2189, *S. violarius* УКМ Ас-2191 і субстанції на основі етанольних екстрактів з біомаси зазначених штамів (співвідношення етанолу до біомаси дорівнювало 4:1);

– тест-культури фітопатогенних грибів із колекції відділу фізіології і систематики мікроміцетів ІМВ НАНУ: *Alternaria alternata* 16814 – збудник альтернаріозу плодів томатів; *Fusarium oxysporum* 54201 – збудник фузаріозу плодів томатів; *F. oxysporum* п.33 – збудник фузаріозної кореневої гнилі пшениці;

– сапрофітні і паразитичні нематоди, у тому числі галові нематоди *Meloidogyne incognita* для визначення нематодцидної дії розроблюваних субстанцій;

– насіння сільськогосподарських культур: пшениці ярої сортів Колективна 3 і Грізо (німецької репродукції) та огірків сорту Ніжинський.

Співробітниками відділу загальної і ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ були розроблені нові субстанції на основі аверкому у комплексі з такими еліситорами як саліцилова кислота і хітозан: стрептовіт (супернатант культуральної рідини *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 + саліцилова кислота), аверком-нова 1 (аверком+стрептовіт) і аверком-нова 2 (аверком + полісахарид хітозан).

Культивування стрептоміцетів. Для культивування стрептоміцетів використовували вівсяний агар і середовище Чапека [4]. Стрептоміцети вирощували поверхневим (на агаризованих середовищах) або глибинним (у рідких середовищах) способами. У першому випадку використовували чашки Петрі чи пробірки. У другому випадку культури вирощували на роторних качалках (240 об./хв) у скляних колбах об'ємом 750 мл (по 50 мл середовища у 1 колбу). Культивування проводили при температурі +28 ± 1°C. Тривалість вирощування складала

6–10 діб, залежно від мети досліджу. Посівний матеріал вирощували впродовж доби і засівали ферментаційне середовище у кількості 5 %/ V.

Визначення антибіотичної активності стрептоміцетів. Антибіотичну активність 10-добових агаризованих культур стрептоміцетів визначали методом блоків, а 6-добових рідких культур – методом циліндриків [4].

Досліди з рослинами. Лабораторні випробування дії культур стрептоміцетів на рослини проводили на насінні пшениці ярої сортів Колективна 3 і Грізо та огірків сорту Ніжинський. Насіння рослин обробляли протягом 2 годин досліджуваними субстанціями, а потім пророщували у чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері при температурі $+20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Досліди з нематодами. Для дослідження антинематодної активності мікробних субстанцій наважки ґрунту (200 г) вміщували у пластикові стаканчики і вносили аверком у концентрації 2,0 мкг/мл за 2 доби або безпосередньо перед висадкою насіння пшениці ярої сорту Колективна 3, яке спочатку замочували в аверкомі (концентрація авермектинів у препараті становила 2 мкг/мл). У контролі насіння замочували у стерильній водогінній воді. Після замочування насіння пророщували 2 доби і висаджували у пластикові стаканчики по 5 зернин у кожній і вирощували протягом 20 діб, підтримуючи вологість ґрунту на рівні 60-70 % повної вологоємності. Наприкінці досліджу відбирали зразки ґрунту для визначення кількості нематод.

Лабораторні досліджу проводили в 3-х кратному повторенні. Розрахунки і статистичну обробку даних виконували за допомогою комп'ютерних програм Statistica 6.0 та Microsoft Excel '00.

Молекулярно-генетичні досліджу. Виділення si/miРНК з клітин дослідних рослин пшениці ярої сорту Грізо та огірків сорту Ніжинський виконували розробленим нами та опублікованим раніше оригінальним методом [7], який складається з наступних етапів:

- виділення сумарного препарату РНК з клітин рослин;
- полімерність виділених сумарних препаратів РНК аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 %-м гелі агарози в присутності 7 М сечовини за методом Локера [12] (гелі забарвлювали розчином етидіумброміду перед фотографуванням фракцій РНК в ультрафіолеті);
- розділення полі(А)⁺РНК (тобто мРНК) та полі(А)⁻РНК проводили на оліго(dT)-целюлозній колонці [13];
- осадження високомолекулярної полі(А)⁻мРНК з елюату проводили за допомогою 10 %-ого розчину поліетиленгліколя (мол. маса 8000) з 0,5 М NaCl, а si/miРНК - рівним об'ємом 96 % етанолу при -22°C впродовж доби; з колонки полі(А)⁺РНК знімали 2-3 об'ємами буферу наступного складу: 10 мМ Трис-НС1 (рН 7,5), 1 мМ ЕДТА, 0,05 % ДДС-Na, а після елюції з колонки полі(А)⁺мРНК осаджували етанолом;
- молекулярна гібридизація в розчині 2xSSC низькомолекулярних si/miРНК з фракцією полі(А)⁺мРНК з наступною температурною (95 $^{\circ}\text{C}$) денатурацією гібридних молекул полі(А)⁺мРНК з si/miРНК;
- відокремлення полі(А)⁺мРНК від si/miРНК методом фракціонування на оліго(dT)-целюлозній колонці;
- повторне осадження si/miРНК 96%-им етанолом та перевірка чистоти виділених si/miРНК за допомогою електрофорезу у 15 %-ому поліакриламідному гелі (ПААГ-електрофорез);
- нативність препаратів полі(А)⁺РНК визначали Нозерн-блот методом [13].

Для дослідів по ДОТ-блот гібридизації si/miРНК з мРНК (через кДНК) дослідних (оброблених субстанціями на інфекційному фоні) та контрольних рослин пшениці і огірків, перед одержанням si/miРНК, її мітили *in vivo* ^{33}P за допомогою $\text{Na}_2\text{HP}^{33}\text{O}_4$ [13].

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом дисперсійного аналізу за Стьюдентом.

Результати та їх обговорення. Антагоністичні властивості культур щодо фітопатогенних грибів оцінювали за зонами відсутності росту тест-культур навколо блоків із стрептоміцетами, вирощеними на різних середовищах (табл. 1). Найбільш активними щодо фітопатогенних грибів виявились *S. marinolimosus* УКМ Ас-2186 і *S. cremeospinus* УКМ Ас-2187: вони пригнічували ріст усіх трьох фітопатогенних грибів - збудників захворювань томатів і пшениці. Діаметри зон відсутності росту коливались від 12 до 30 мм. Менш активними були *S. violans* УКМ Ас-2189 і *S. violarus* УКМ Ас-2191; слід відмітити, що рівень антагоністичної актив-

ності зазначених культур стрептоміцетів був вищим за активність *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 – продуценту антибіотика авермектину, який було взято для порівняння.

Таблиця 1

Антагоністична дія стрептоміцетів на фітопатогенні гриби

Стрептоміцети	Діаметр зон відсутності росту, мм					
	<i>Alternaria alternata</i> 16814		<i>Fusarium oxysporum</i> 54201		<i>Fusarium oxysporum</i> п.33	
	Середовища для вирощування стрептоміцетів					
	1*	2*	1	2	1	2
<i>S. marinolimosus</i> УКМ Ас-2186	30	24	15,5	20	12	13
<i>S. cremeospinus</i> УКМ Ас-2187	23	19	14	14	12	13
<i>S. violans</i> УКМ Ас-2189	0	21,5	0	17	12	14
<i>S. violarius</i> УКМ Ас-2191	21,5	16	18	11	14	12
<i>S. avermitilis</i> УКМ Ас-2179	19	0	12,5	0	11	12

Примітка: * 1 – вівсяний агар, 2 – середовище Чапека, m = ±0,7 – ±2,8;

«0» – антагонізму не виявлено

Враховуючи те, що досліджувані культури стрептоміцетів-антагоністів призначені для використання в рослинництві, ми вважали за необхідне вивчити їх вплив на рослини. Насіння пшениці ярої сорту Грізо обробляли супернатантами культуральних рідин (КР) зазначених стрептоміцетів (табл.2).

Таблиця 2

Дія супернатантів культуральних рідин відібраних стрептоміцетів

на ріст проростків пшениці ярої сорту Грізо

Варіант дослідю	Витрата КР*, мл/г насіння	Довжина коренів		Висота стебел		Сира маса 100 проростків	
		мм	% до К	мм	% до К	Г	% до К
Контроль (К)	0	41,7	100	32,0	100	12,5	100
<i>S. marinolimosus</i> УКМ Ас-2186	50	46,0	110,4	33,9	105,3	12,9	103,2
<i>S. cremeospinus</i> УКМ Ас-2187	50	48,0	115,1	36,3	113,3	14,0	112,0
<i>S. violarius</i> УКМ Ас-2191	50	42,9	102,9	34,4	107,4	12,8	102,4

Примітка: m = ± 1,25±1,43.

КР - супернатант культуральної рідини стрептоміцету

Найкращі умови, з огляду на результати, склалися за дії КР *S. cremeospinus* УКМ Ас-2187: ріст коренів, довжина стебел і накопичення біомаси проростків зростали відповідно на 15, 13 і 12 % порівняно з контролем, де насіння пшениці обробляли еквівалентною кількістю стерильної водогінної води. За дії КР інших досліджуваних стрептоміцетів ці показники також були загальною вище за контрольні.

Отже, отримані результати свідчать про стимулюючі властивості цих культур щодо рослин пшениці.

Окрім перевірки нових штамів стрептоміцетів також були проведені дослідження дії на рослини нових субстанцій: стрептовіту і композицій аверкому з елісаторами. Дані щодо дії зазначених субстанцій на насіння ярої пшениці сорту Грізо наведені у табл. 3. Усі розроблені композиції стимулювали ріст проростків і корінців порівняно з контролем (замочування у воді). Порівняно з базовим препаратом аверком його модифікована субстанція - стрептовіт (супернатант культуральної рідини *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 + саліцилова кислота), більш активно діяла на ріст корінців (119 %) та збільшувала сиру масу проростків (118 %). Аверком – нова 1 (аверком+стрептовіт) і аверком – нова 2 (аверком +хітозан) також стимулювали ріст корінців більш активно порівняно з аверкомом.

Для вивчення нематодичної дії досліджуваних субстанцій нами був проведений аналіз видового складу гельмінтів в природно інфікованому ґрунті (табл. 4). Кількість фітогельмінтів, які уражують рослини, була високою і сягала 584 особини/100 см³ ґрунту. Серед паразитичних нематод переважали представники виду *Pratylenchus pratensis*, чисельність яких перевищувала допустиму норму у 2,4–3,7 рази, а також представники виду *Tylenchorbynchus dubius* – у 5,2–5,4 рази. Були виявлені також сапробіонтні нематоди і представники мікогельмінтів, які рослинам не шкодять.

Вплив субстанцій на проростки рослин ярої пшениці сорту Грізо за обробки насіння

Біопрепарати	Довжина стебел		Довжина коренів		Сира маса 100 проростків	
	мм	% до контролю	мм	% до контролю	Г	% до контролю
Контроль (вода)	35,0	100	57,0	100	14,2	100
Аверком 2,5 мл/т	40,3	115	63,2	111	15,5	109
Стрептовіт 10 мл/т	37,3	107	68,0	119	16,8	118
Аверком–нова 1 2,5 мл/т	39,3	112	67,6	119	15,6	110
Аверком–нова 2 2,5 мл/т	36,9	103	67,1	118	16,4	116

Примітка: m = ± 1,18 ± 1,40

Чисельність нематод у інфікованому ґрунті
(особин в 100 см³ ґрунту)

Варіанти дослідів	Фітогельмінти			Міко-гельмінти	Сапро-біонти
	усього	у т. ч.: <i>Pratylenchus pratensis</i>	у т. ч.: <i>Tylenchorhynchus dubius</i>		
Контроль (без обробки)	584	128 норма (35 – 53)	456 норма (84 – 88)	552	3352
Аверком, 2 мкг/мл перед висадкою	375	0	375	375	3975
Аверком, 2 мкг/мл за 2 доби перед висадкою	135	0	135	162	2033

Перед посадкою насіння пшениці ярої сорту Колективна 3 була проведена санація ґрунту шляхом обробки його аверкомом. Ефективним було внесення препарату за 2 доби перед висадкою насіння: загальна чисельність фітогельмінтів у ґрунті зменшилася у 4,3 рази, представників *Tylenchorhynchus dubius* – у 3,4 рази. Найбільш вразливими виявились представники *Pratylenchus pratensis*, обробка аверкомом викликала їхню повну загибель.

Після перевірки ефективності дії аверкому у ґрунт, природно інфікований нематодами, було висаджено насіння пшениці ярої сорту «Колективна 3», яке було оброблене аверкомом. Пшениця вирощувалась протягом 20 діб, після чого був проведений облік нематод. У дослідних варіантах спостерігали подальше зниження чисельності паразитичних фітонематод на 90–93 % порівняно з контролем.

Нами були проведені дослідження захисної дії нових модифікацій аверкому на насіння огірків сорту «Ніжинський» за умов штучного інфекційного фону і без нього. У інтактних рослин за відсутності дії нематод відмічали стимулювальну дію аверкому і стрептовіту на ріст стебел і накопичення сирової маси проростків – ці показники в досліді були відповідно на 10–34 % і 7–27 % вищі порівняно з контролем (табл. 5).

Захисну дію препаратів визначали на штучному інфекційному фоні. Для цього у кожен чашку Петрі, де пророщували насіння протягом 3 діб, додавали по 0,1 г коренів рослин, уражених галовими нематодами *M. incognita*. Результати розвитку проростків враховували на 10-у добу дослідів. Як показали одержані дані, найвищу захисну дію проти нематод мав аверком–нова 1, за обробки насіння яким не було відмічено проявів пригнічення розвитку рослин: довжина стебел, коренів і сира маса проростків становили 99 – 108 % порівняно з незараженим контролем. Дещо нижчою захисною дією характеризувався аверком–нова 2: довжина стебел проростків порівняно з контролем становила 77,8 %, довжина коренів – 105 %, сира маса проростків – 93 % порівняно з інтактним контролем.

В молекулярно-генетичних експериментах визначали відсоток гомології складових імунної системи si/miРНК до мРНК контрольних інтактних та дослідних рослин огірків сорту Ніжинський та ярої пшениці сорту Грізо. В табл. 6 наведені результати дослідів щодо гомології мРНК контрольних рослин до si/miРНК з 7-денних проростків дослідних рослин огірків, які оброблялись біозахисними субстанціями із регулюючими ріст властивостями. Так, порівняно

з контролем (98 % гомології) під дією препарату аверком у концентрації 2 мкг/мл відсоток гомології зменшується на 4 %, а під дією препарату на інфекційному фоні (у присутності личинок галової нематоди *M.incognita*) відсоток гомології становить 88 %, тобто зменшується на 10 %. Порівнюючи ці дані з результатами розвитку проростків (табл. 5) слід зазначити, що за умов застосування біосубстанцій, дослідні рослини зберігали життєздатність, хоча дещо пригнічувався їх ріст і розвиток, тоді як рослини, що пророщували на інфекційному фоні без застосування авермектинвмісних препаратів, гинули на 4–5-у добу досліді. Близькі до цього результати були одержані і при використанні препарату аверком у меншій концентрації ($2 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл) як при дії препарату на інфекційному фоні, так і без нього.

Таблиця 5

Вплив субстанцій на проростки огірка сорту Ніжинський

№	Біопрепарати	Довжина стебел		Довжина коренів		Сира маса 100 проростків	
		мм	% до контролю	мм	% до контролю	г	% до контролю
Інтактні рослини							
1	Контроль (вода)	30,5	100	42,8	100	1,37	100
2	Аверком 0.01 мл/кг	41,0	134	38,2	89	1,73	127
4	Стрептовіт 0,025 мл/кг	33,5	110	30,5	71	1,47	107
5	Аверком-нова 1 0.02 мл/кг	25,7	84	34,7	81	1,36	99
7	Аверком-нова 2 0,02 мл/кг	30,5	100	51,4	120	1,79	131
На фоні штучного інфікування <i>M. incognita</i> .							
1	Контроль (без зараження нематодами)	23,0	100	31,6	100	10,5	100
2	Контроль із зараженням нематодами	Проростки гинули на 4-5-у добу досліді					
2	Аверком 2мкг/мл	19,7	86	29,0	92	9,8	93
3	Аверком 0,002 мкг/мл	16,5	72	29,5	93	8,1	77
4	Стрептовіт 0,025 мл/кг	21,6	94	24,5	78	10,6	101
5	Стрептовіт 0,015 мл/кг	17,6	77	37,2	118	10,7	102
6	Аверком-нова 1 0,005 мл/кг	23,0	100	31,4	99	11,3	108
7	Аверком-нова 2 0,015 мл/кг	17,9	90	33,2	105	9,8	93

Таблиця 6

Відсоток гомології si/miРНК проростків огірків сорту Ніжинський до мРНК (через кДНК) контрольних рослин

Мікробні субстанції	% гібридизації si/miРНК з гомологічними мРНК контрольних інтактних проростків огірків	% гібридизації мРНК контрольних рослин з si/miРНК рослини, одержаних з насіння, обробленого препаратом	% гібридизації мРНК контрольних рослин з si/miРНК рослини, одержаних з насіння, обробленого препаратом, що пророщувалося в присутності личинок нематод
Дистильована вода (контроль)	98±0,96*	–	–
Аверком, 2 мкг/мл		94±1,2**	88±1,4**
Аверком, $2 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл		96±1,3**	84±1,6**
Стрептовіт, 0,025 мкг/мл		95±1,4**	88±1,3**
Стрептовіт, 0,015 мкг/мл		96±1,1**	89±1,2**
Аверком-нова-1, 0,015 мкг/мл		92±1,6**	82±1,4**
Аверком-нова 2, 0,005 мкг/мл		94±1,4**	88±1,4**

Примітка: наявність достовірних відмінностей дослідних показників** щодо контролю*, $p < 0,05$, $n = 3$
 “–“ не досліджено.

При використанні стрептовіту були одержані показники гомології, ближчі до контрольних порівняно з аверкомом у рослин як не інфікованих, так і інфікованих. За обробки насіння збільшеною дозою (0,025 мкг/мл) знижувався відсоток гомології на 3 % порівняно з контрольними рослинами, а при обробці стрептовітом інфікованих рослин в цій концентрації відбувалось зниження відсотка гомології на 10 %. Аверком-нова 1 знижував на 6% відсоток гомології порівняно з контролем у інтактних рослин і на 16 % порівняно з контролем на інфекційному фоні; аверком-нова 2 відповідно – на 4 і 10%.

Таким чином, розглянуті композиційні препарати знижують % гомології si/miРНК відносно мРНК контролю у інтактних рослин в діапазоні 2–6 %. У інфікованих рослинах на фоні біозахисної дії субстанцій показники відсотку гомології були на 9–16 % нижчими порівняно з контролем і на 6–12 % порівняно з неінфікованими рослинами. Це означає, що обробка композиційними препаратами призводить до популяційних змін як транскриптів мРНК, так і si/miРНК, а також додаткових змін під впливом інфекції.

У другій серії дослідів ми вивчали у вегетаційних експериментах ступінь гомології si/miРНК до мРНК дорослих (одномісячних) рослин пшениці, які були одержані з насіння, обробленого біозахисними субстанціями, а також до мРНК двомісячних рослин, які одержувались з насіння, обробленого регуляторами та вирощувались на інфекційному фоні, створеному мікроміцетом *F. oxysporum* (табл. 7). У зв'язку з різною тривалістю вирощування рослин використовували відповідно 2 контролю, вказані в табл. 7. Вивчали дію хімічного фунгіцида Махім порівняно з біологічними субстанціями. Показано, що фунгіцид знижує на 9 % відсоток гомології з рослинами у контролі 1 і на 3% порівняно з інфікованими рослинами у контролі 2 (тобто без дії препаратів). При використанні субстанції на основі *S. marinolimosus* УКМ Ас-2186 виявлено, що у неінфікованих рослин відсоток гомології щодо контролю 1 знижувався на 3%, а у інфікованих при дії субстанції становив 89 %, що на 9 % нижче порівняно з контролем 1 і на 5% більше за контроль 2. Під дією субстанцій на основі штамів *S. cremeospinus* УКМ Ас-2187 і *S. violarus* УКМ Ас-2191 у інтактних рослин відсоток гомології був нижче на 3–5%, ніж у контролі, а за умов штучної інфекції при використанні субстанції з *S. marinolimosus* УКМ Ас-2186 був на 6 % вище ніж у контролі 2. Подібну різницю в гомології відмічено і за дії субстанції з *S. violarus* УКМ Ас-2191. Подальше зниження відсотку гомології на 4-6 % в досліді 1 спостерігалось при використанні суміші екстрактів вказаних вище 3-х штамів стрептоміцетів (Міх) і складало 89 %.

Таблиця 7

Ступінь гомології (%) si/miРНК з мРНК (через кДНК) одномісячних рослин пшениці сорту Грізо, одержаних з насіння, обробленого біозахисними препаратами і вирощеного на безінфекційному фоні та двомісячних рослин за штучної інфекції *Fusarium oxysporum*

№ п/п	Назви біозахисних субстанцій (екстракти з біомаси стрептоміцетів)	Варіанти дослідів	
		Без зараження	За штучної інфекції <i>F. oxysporum</i>
1	Контроль 1 — рослини, вирощені без обробки препаратами на безінфекційному фоні.	98±0,96*	-
2	Контроль 2—(рослини, вирощені на інфекційному фоні без обробки субстанціями	-	83±1,2*
3	Максім (хімічний фунгіцид)	89±1,4**	80±1,5
4	<i>S. marinolimosus</i> УКМ Ас-2186	95±1,2	89±1,3**
5	<i>S. cremeospinus</i> УКМ Ас-2187	93±1,4**	-
6	<i>S. violarus</i> УКМ Ас-2191	94±1,1**	89±1,6**
7	Міх штамів 2186 +2187 +2191	89±1,6**	-
9	Аверком	94±1,8**	-

Примітка: а) “-” не досліджено;

б) наявність достовірних відмінностей дослідних показників** щодо контролю*, p<0,05, n=3

в) % гомології у контролі (у колонці 1) розраховувався за % гібридації si/miРНК до гомологічних мРНК рослин, що не оброблялися препаратами і стрептоміцетом;

г) відповідно % гомології у контролі у колонці 2 розраховувався за % гібридації si/miРНК до гомологічних мРНК рослин, що вирощувались на інфекційному фоні;

д) розрахунки % гомології в колонках 1 та 2 віднесено до контрольних показників у цих колонках.

Препарат аверком в концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл зменшував відсоток гомології на 4 %. Отже на фоні грибової інфекції щодо контролю 2 відсоток гомології підвищувався при застосуванні субстанцій на основі зазначених штамів на 6-9%.

Обговорюючи одержані дані, слід зазначити, що експериментальні роботи останніх років свідчать про здатність si/miРНК регулювати у більшості еукаріот експресію генів у таких клітинних процесах як цілісність та стабільність геному, диференціація клітин, формування та розвиток органів, тривалість життя, адаптивну відповідь на біотичний та абіотичний стреси [17]. Отримано факти, які підтверджують участь si/miРНК у захисних реакціях імунної системи рослин у відповідь на ураження паразитичними та патогенними організмами [9, 11]. Ендогенні si/miРНК представляють собою короткі некодуючі РНК молекули (розміром 20–24 нт), що утворюються з подовжених (~70 нт) pre-miРНК та дволанцюгових dsРНК (double-stranded RNA) попередників - транскриптів з різних геномних локусів шляхом ендонуклеазного розщеплення за допомогою Dicer-подібної (DCL) рибонуклеази - RNase-III та функціонують спільно з Argonaute (AGO) білками в РНК-індукованому сайленсінговому комплексі (RISC) – головному учаснику посттранскрипційного сайленсінгу генів (PTGS) [16]. У ході цього процесу малі регуляторні si/miРНК діють двома шляхами: блокують трансляцію або власних мРНК-транскриптів генів, що контролюють ріст та розвиток рослин, експресія яких індукується патогенами [10], або молекул-мішеней мРНК патогенних і паразитичних організмів (завдяки присутності в них антисенсових з високим ступенем гомології нуклеотидних послідовностей), а також знищують їх шляхом ферментативного розщеплення (за допомогою екзо- та ендонуклеаз RISC комплексу) [16]. Крім участі в PTGS встановлено також головну роль si/miРНК в іншій важливій захисній відповіді імунної системи рослин на проникнення патогенів - процесі транскрипційного сайленсінгу генів (TGS), внаслідок якого відбувається або метилювання ДНК, або модифікація хроматину за участю si/miРНК [14].

В наших молекулярно-генетичних дослідженнях одержано достовірні розбіжності в показниках відсотків гомології si/miРНК, ізольованих із 7-денних проростків огірків сорту Ніжинський, оброблених біозахисними субстанціями і вирощених на безнематодному середовищі та інфекційному фоні (у присутності личинок голової нематої *M. incognita*), до мРНК контрольних рослин, що не оброблялись субстанціями та пророщувались на безнематодному фоні. Методом ДОТ-блот гібридизації si/miРНК з мРНК дорослих (одномісячних) рослин пшениці ярої сорту Грізо, оброблених біозахисними субстанціями з регулюючою ріст активністю в вегетаційних дослідках та двомісячних рослин, що вирощувались на інфекційному фоні, створеному мікроміцетом *F. oxysporum*, встановлено також достовірні зміни в показнику відсотка гомології si/miРНК до мРНК, в особливості за сумісної дії *F. oxysporum* та біозахисних субстанцій. Очевидно, одержані нами суттєві зміни у популяційних характеристиках si/miРНК свідчать, що біологічний ефект (підвищення стійкості рослин до патогенних та паразитичних організмів) досліджуваних субстанцій відбувається шляхом “включення” (активації) ними генів в мультигенних сімействах генів, які контролюють синтез в клітинах рослин захисних малих регуляторних si/miРНК із антипатогенною та антипаразитарною активністю.

Таким чином, у проведеній роботі відібрано перспективні культури стрептоміцетів, які одночасно виявляють інгібуючий ефект до фітопатогенних грибів, нематод, позитивно впливають на ріст проростків рослин (озима та яра пшениці, огірки). Розроблені нові модифікації препарату аверком, які в умовах лабораторного дослідження характеризувались підвищеною фітозахисною дією щодо нематод. Виявлено вплив нових субстанцій, синтезованих ґрунтовими стрептоміцетами на синтез si/miРНК.

Робота виконана за фінансової підтримки наукового проекту «Молекулярні основи створення біологічно активних та екологічно безпечних препаратів з біозахисними та імуномодулюючими властивостями» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій».

**В.А. Циганкова¹, Я.В. Андрусевич¹, Л.А. Белявская², В.Е. Козырицкая²,
Г.А. Иутинская², А.П.Галкин³, Т.А.Галаган⁴, Е.В.Болтовская⁴**

¹Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев
²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев,
³Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
⁴Институт защиты растений НААН Украины, Киев

РОСТСТИМУЛИРУЮЩИЕ, ФУНГИЦИДНЫЕ И НЕМАТИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ СУБСТАНЦИЙ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СИНТЕЗ si/mi РНК В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

Р е з ю м е

Новые субстанции на основе метаболитов почвенных стрептомицетов, а также композиции препарата аверком с элиситорами проявляют рострегулирующую активность и биозащитные свойства, подтвержденные в опытах на пшенице яровой сорта Гризо и на огурцах сорта Нежинский. Большинство созданных субстанций проявляют антагонистическое действие на фитопатогенные грибы, а также нематодцидную активность по отношению к галловой нематоды *Meloidiodyne incognita*. В условиях искусственного инфицирования нематодами препарат аверком и его модификации проявляют 85-100%-ое защитное действие на проростки огурца сорта Нежинский. Методом ДЮТ-блот гибридизации выявлены значительные различия в показателе процента гомологии между малыми регуляторными РНК (si/miРНК) и мРНК опытных (которые обрабатывались субстанциями на инфекционном фоне) и контрольных растений огурцов и пшеницы. Обсуждена роль si/miРНК в повышении резистентности растений к патогенным и паразитическим организмам при применении разработанных субстанций.

Ключевые слова: стрептомицеты, фитопатогенные грибы, нематоды, растения, малые регуляторные РНК (si/miРНК).

**V.A. Tsygankova², Ya.V. Andrushevich¹, L.A. Beljavskaia², V. E., Kozyrtskaja², H.A. Iutinskaja²,
A.P. Galkin³, T.A. Galagan⁴, E.V. Boltovskaya⁴**

¹ Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
³ Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
⁴ Institute of Plant Protection, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv

GROWTH STIMULATING, FUNGICIDAL AND NEMATOCIDAL PROPERTIES OF NEW MICROBIAL SUBSTANCES AND THEIR IMPACT ON si/miRNA SYNTHESIS IN PLANT CELLS

S u m m a r y

New substances on the basis of soil streptomycete *Streptomyces avermitilis* metabolites and also compositions of preparation averkom with elicitors show growth regulating activity and bioprotective properties, proved in experiments with wheat spring of variety Grizo and cucumbers of variety Nezhinskiy. Most of the created substances possess the antagonistic action in relation to phytopathogenic fungi, as well as antinematode activity in relation to the gallic nematode *Meloidiodyne incognita*. In the conditions of the artificial nematode infecting the preparation averkom and its modifications demonstrate protective action (up to 85-100 %) on cucumber sprouts of Nezhinskiy variety. The considerable differences were found out in the index of homology percentage between small regulatory RNA (si/miRNA) and mRNA of experimental (that were treated by substances on the infectious background) and control cucumbers, and wheat plants.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у в о р д s: streptomycetes, phytopathogenic fungi, nematodes, plants, small regulatory RNA (si/miRNA).

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Tsygankova V.A., Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 1, Murmanska St., Kyiv, 02094, Ukraine.

1. Андриюк К.И., Иутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін. Функціонування мікробних ценозів в умовах антропогенного навантаження. – К.: Обереги, 2001. – 240 с.
2. Биорегуляция микробно-растительных систем / Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андриюк К.И. и др. – Под ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко – Киев: Ничлава, 2010. – 464 с.

3. Курдію І.К. Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми \ К.: НП НВП «Наукова думка». – 2010. – 256 с.
4. Методи ґрунтової мікробіології та біохімії / Під ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 303 с.
5. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика / Волкогон В.В., Надкренічна О.В., Ковалевська Т.М. та ін. / За ред. Волкогона В.В. – К.: Аграрна наука, 2007. – 312 с.
6. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: Монографія / Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М. і ін. / За ред. В.П. Патики – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
7. Циганкова В.А., Андрусевич Я.В., Блюм Я.Б. Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/miРНК з антинематодною активністю // ДАН України. – 2011. – № 9. – С. 159–164.
8. Циганкова В.А., Стефановська Т.Р., Андрусевич Я.В., Пономаренко С.П., Галкін А.П., Блюм Я.Б. Індукція регуляторами росту біосинтезу si/miРНК з антипатогенними та антипаразитарними властивостями в клітинах рослин // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 3. – С. 62–74.
9. Fuller V.L., Lilley C.J., Urwin P.E. Nematode resistance // New Phytologist. – 2008. – **180**. – P. 27–44.
10. Hewezi T., Howe P., Maier T.R., Baum T.J. Arabidopsis small RNAs and their targets during cyst nematode parasitism // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2008. – **21**, N 12. – P. 1622–1634.
11. Katiyar-Agarwal S., Morgan R., Dahlbeck D. et al. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**. – P. 18002–18007.
12. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea // Anal. Biochem. – 1979. – **98**, N 2. – P. 358–367.
13. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. – New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982. – 480 p.
14. Matzke M., Kanno T., Huettel B., Daxinger L., Matzke A.J.M. Targets of RNA-directed DNA methylation // Curr. Opin. Plant Biol. – 2007. – **10**, N 5. – P. 512–519.
15. New plant growth regulators: basic research and technologies of application: Monograph / Ed. S.P. Ponomarenko, G.O. Iutynska. – Kyiv: Nichlava, 2011. – 211 p.
16. Park W., Li J., Song R., Messing J. and Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, Act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* induced silencing complex (RISC), which targets homologous RNAs for degradation // Current Biology. – 2002. – **12**. – P. 1484–1495.
17. Zhang, B., Wang Q. and Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants // J. Cell. Physiol. – 2007. – **210**. – P. 279–289.

Отримано 15.08.2011