

ІНДУКЦІЯ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТУ БІОСИНТЕЗУ si/miRNA З АНТИПАТОГЕННИМИ ТА АНТИПАЗИТАРНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ В КЛІТИНАХ РОСЛИН

В. А. Циганкова¹
Т. Р. Стефановська²
Я. В. Андрусевич¹
С. П. Пономаренко³
А. П. Галкін⁴
Я. Б. Блюм⁴

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ
²Національний університет біоресурсів і природокористування
України, Київ
³Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех»
НАН і МОН України, Київ
⁴Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

E-mail: vTsygankova@ukr.net

Отримано 13.02.2012

У лабораторних дослідах показано, що композиційні полікомпонентні препарати з біозахисними властивостями Біоген, Стімпо і Регоплант за показниками проростання та швидкості росту проростків значно підвищують (до 35–70%) стійкість цукрового буряку до цистоутворювальної нематоди *Heterodera schachtii* та галової нематоди *Meloidogyne incognita* і ярої пшениці сорту Грізо до патогенного мікроміцета *Fusarium oxysporum graminearum*. Встановлено, що максимальне зменшення (~на 80%) кількості личинок нематоди *H. schachtii* в коренях цукрових буряків відбувається в разі оброблення насіння регуляторами росту в найбільш ефективних концентраціях: Стімпо — 5 мкг/мл, Регоплант — 1 мкг/мл та Біоген — 1 мкг/мл.

Молекулярно-генетичним методом дот-блот-гібридизації мРНК з кДНК і дослідженням функціональної активності si/miRNA в безклітинній системі протеїнового синтезу вперше показано, що стійкість рослин цукрового буряку до нематод *H. schachtii* та *M. incognita* і рослин ярої пшениці сорту Грізо до патогенного мікроміцета *Fusarium oxysporum graminearum* досягається стимуляцією синтезу малих регуляторних si/miРНК.

Ключові слова: регулятори росту рослин, малі регуляторні РНК (si/miRNA), стійкість рослин до шкідників, безклітинна система протеїнового синтезу із проростків пшениці.

Однією з головних проблем сучасного сільського господарства є створення високо-ефективних і екологічно безпечних агротехнологій, які здатні підтримувати стійкість агросистем, спрямовані на якомога ширше використання біологічного захисту рослин від шкідливих організмів, а також сприяють поліпшенню якості врожаю. Сільське господарство майже усіх країн потерпає від шкідливих організмів — комах і кліщів, мікроорганізмів (бактерії, гриби, віруси), нематод (фітогельмінтів) та бур'янів. За даними Організації з продовольства і сільського господарства ООН (ФАО), щорічно світові втрати урожаю продовольчих культур становлять приблизно 20–25%. До найбільш поширених і небезпечних шкідників, що вражають такі важливі для сільського господарства культури, як пшениця, кукурудза, ячмінь, соя, ріпак, належать: стебловий кукурудзяний метелик, озима совка, шведська муха, дротяники, люцернова сов-

ка, акацієва вогнівка, бульбочкові довгоносики, соєва плодожерка і павутинний кліщ, трипси, ріпаковий квіткоїд, блішки, ріпаків білан, лучні клопи, попелиці. Не менш актуальною є проблема захисту рослин від широко розповсюджених грибкових, бактеріальних та вірусних захворювань, таких як фузаріоз, церкоспороз, аскохітоз, склеротиніоз, пероноспороз, вертицильозне в'янення, борошниста роса, бура листова іржа, бактеріальний опік, жовта мозаїка сої та ін. [1]. Сумарні втрати врожаю сільськогосподарських культур від хвороб, спричинених різними патогенними організмами, сягають в Україні 50%.

Одним з розповсюджених і шкідливих паразитів рослин є нематоди. Втрати урожаю від ураження рослин паразитичними нематодами в різних країнах становлять від 25% до 70%, а за екстремальних умов можуть сягати 90–100% [1]. Встановлено, що загальні щорічні втрати врожайів від фіто-

гельмінтів у грошовому еквіваленті в усьому світі становлять 100 млрд. доларів США [2]. Життєдіяльність усіх ґрунтових нематод (фітопаразитичних й вільноіснуючих) тісно зв'язана, з одного боку, з вегетуючими рослинами, а з другого — з фітопатогенними і сапрофітними бактеріями і грибами, вірусами та іншими організмами, що беруть участь у розвитку хвороб рослин, спричинених фітогельмінтами.

У наш час представники понад 20 родів фітонематод зареєстровані як облігатні паразити вищих рослин. Більшість із них належить до ряду *Tylenchida* Thorne, родини *Heteroderidae*. Для країн Європи, у тому числі для Росії й України, найбільшу небезпеку для сільськогосподарських рослин становлять цистоутворювальні нематоди *G. rostochiensis*, *G. pallida* і *G. tabaccum*. Перші дві викликають глободероз рослини і спричинюють зниження врожаю картоплі (іноді до 60%); обидва види включено до переліку карантинних об'єктів Європейської організації із захисту рослин. Окрім зазначених нематод, широко розповсюджені і завдають великої шкоди картоплі бульбова нематода (*Ditylenchus destructor*), нематоди – переносники вірусів (*Paratrichodorus teres*, *Xiphinema diversicaudatum*, *Longisporus elongatus*), інші кореневі нематоди (*Paratylenchus*, *Helycotylenchus*). Усі перелічені паразитичні нематоди особливо великого збитку завдають на тлі вірусних захворювань картоплі й в умовах Центральної Європи знищують 88% урожаю [3]. У закритому ґрунті оранжерей і теплиць найбільш шкодочинними є три види галових нематод: *Meloidogyne incognita* (південна), *Meloidogyne javanica* (яванська) *Meloidogyne arenaria* (арахісова), що спричинюють небезпечне захворювання — мелойдогіноз. Ці паразитичні організми уражують і овочеві культури відкритого ґрунту: томати, баклажани, картоплю, цукрові й столові буряки, моркву, баштанні культури тощо [4].

Не менш шкідливою є бурякова цистоутворювальна нематода *Heterodera schachtii* Schmidt – небезпечний шкідник, що зумовлює гетеродероз цукрових буряків у майже 40 країнах світу [5]. Втрати врожаю від цього фітогельмінта становлять 95% від усього комплексу шкідливих організмів культури. В Україні бурякова нематода поширена у Вінницькій, Сумській, Чернігівській, Черкаській, Харківській областях, де втрати врожаю буряків досягають 30% [6]. Важлива особливість паразита — здатність розвиватися на рослинах з 25 ботанічних

родин, зокрема на культурних рослинах (ріпаку, капусти, олійній редьці, гірчиці) та бур'янах з родини капустяних (*Brassicaceae*), а також на бур'янах з родини *Chenopodiaceae* [6]. Основним методом профілактики шкідника є дотримання сівозміни. Існує група культур, які нематода не вражує: зернові колосові, зернобобові, кукурудза, картопля, багаторічні трави. Вирощування цих культур сприяє очищенню ґрунту від нематоди. Розміщення цукрових буряків після попередника, який ушкоджується цією нематодою, сприяє збільшенню чисельності популяції шкідника. Особливо великі втрати врожаю від нематоди спостерігаються під час вирощування цукрових буряків у монокультурі та за великої концентрації (до 60–80%) у сівозміні її культур-хазяїв. В останні роки внаслідок збільшення площ вирощування ріпаку зростає ризик підвищення шкідливості бурякової нематоди у бурякових сівозмінах, а відтак питання обмеження чисельності цього небезпечного шкідника стає дедалі гострішим [7].

До найбільш ефективних методів обмеження чисельності нематод-шкідників належать вирощування стійких до них сортів та оброблення насіння рослин нематицидами. Нематициди було заборонено до використання наприкінці 80-х років минулого сторіччя в більшості країн світу через їх надзвичайно високу токсичність, негативний вплив на довкілля та здоров'я людини. Тому вкрай важливим для регуляції чисельності фітогельмінтів є застосування речовин хімічного чи біологічного походження, які є менш токсичними та більш безпечними для довкілля. До високоефективних антипаразитарних засобів належать препарати, розроблені на основі авермектинів, аверсектинів та абамектинів — комплексних антипаразитарних антибіотиків (продуцент — штам ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis*). Результати досліджень, проведених упродовж останніх 20 років у США, Західній Європі та Росії, показали, що використання авермектину та абамектину знижує чисельність фітопаразитичних нематод на різних культурах [8], зокрема томатах [9], банані [10], бавовнику [11], тютюнові [12] та на часнику [13]. Найбільш ефективним є використання авермектинів проти галових нематод *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*. Відомо також про ефективність дії препаратів проти стеблової нематоди *Ditlenchus dipsaci*, внутрішньокореневої нематоди *Rotylenchulus reniformis* та фітопаразита *Tylenchulus semipenetrans*. Ефективним

є оброблення насіння бавовнику абаментином проти галових нематод, цукрових буряків — проти бурякової нематої та кукурдзи — проти *P. pratensis* [11, 14].

В Україні в останні роки дедалі ширше використовують вітчизняні антипаразитарні препарати, найефективнішим з яких є Аверком, створений на основі авермектинів — комплексних антипаразитарних антибіотиків (штам-продуцент — ґрунтовий стрептоміцет *Streptomyces avermitilis*) співробітниками Інституту мікробіології та вірусології НАН України [15, 16]. Було встановлено, що цей препарат підвищує імунізаційні властивості рослин, прискорює їх ріст та обмежує шкідливість паразитичних організмів — нематод [15]. Проведені лабораторні дослідження показали, що у високих концентраціях Аверком спричинює 80% -ну загибель личинок нематод *Meloidogyne incognita*. Оброблення ґрунту в лабораторних умовах препаратом призводило до зменшення комплексу фітогельмінтів у чотири рази [16].

До нових ефективних вітчизняних препаратів з антинематодною та антипатогенною дією належать також створені в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України разом із Державним підприємством «Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» НАН і МОН України» композиційні поліфункціональні препарати Біоген, Стімпо та Регоплант. Біоохисні властивості їх зумовлені синергічним ефектом взаємодії продуктів життєдіяльності в культурі *in vitro* гриба-міксоміцета, вилученого з кореневої системи женьшеню (суміш амінокислот, вуглеводів, жирних кислот, полісахаридів, фітогормонів та мікроелементів), та аверсектинів — комплексних антипаразитарних макролідних антибіотиків, продуктів метаболізму ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis* [1]. Стрептоміцети відомі як продуценти не лише антибіотиків, але й таких біологічно активних речовин, які виявляють фітозахисну і рістстимулювальну дію на рослини. Це — різноманітні гормони, вітаміни, амінокислоти, каротиноїди, ензими, токсини та інші речовини, які впливають на ростові процеси рослин, стимулюючи проростання насіння і підвищуючи врожайність [15, 16].

Як виявлено в проведених нами молекулярно-генетичних дослідженнях [17, 18], ці препарати значно підвищують стійкість рослин до різних патогенів завдяки стимуляції ними синтезу власне клітинних малих регуляторних РНК (small regulatory RNA), що беруть участь у RNAi (RNA interference)

процесі, який прийнято називати посттранскрипційним сайленсингом генів (PTGS) у рослин, тварин та грибів [19–24]. Сайленсинг генів — процес, у результаті якого відбувається або деградація, або блокування трансляції молекул-мішеней mRNA, має велике значення в адаптаційній резистентності до вірусів, у захисті геному проти мобільних ДНК-елементів, а також в онтогенетичній регуляції експресії генів. Головну роль у сайленсингу виконують малі регуляторні si/miРНК розміром 22–24 нт [19–24], що синтезуються з попередників — дволанцюгових dsRNA (double-stranded RNA) транскриптів ендонуклеазним розщепленням за допомогою РНКаза-III подібних ензимів. Разом зі сайт-специфічними ендонуклеазами si/miRNA або блокують (сайленсують) трансляцію аберантних та недосконалих за структурою власне клітинних мРНК, а також мРНК патогенів і паразитів, або ензиматично розщеплюють ці молекули-мішені мРНК, що й призводить до їх деградації [19–33].

Метою нашої роботи було визначення можливості за допомогою вищезазначених композиційних препаратів підсилювати синтез ендогенних малих регуляторних si/miRNA як основних складових імунної системи рослин.

Матеріали і методи

У досліджах використовували рослини цукрового буряку *Beta vulgaris L.*, інфіковані в лабораторних або тепличних умовах цистоутворювальною коренепаразитуючою нематодою *H. shcachtii* і галовою нематодою *M. incognita*, а також рослини ярої пшениці сорту Грізо, інфіковані патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*. В експериментах з визначення сортової чутливості до регуляторів росту використовували сорти озимої пшениці Ятрань 60, Володарка, Смуглянка та Подолянка, люб'язно надані академіком НАН України В. А. Моргуном. Дослідні рослини обробляли композиційними полікомпонентними препаратами Регоплант, Стімпо, Біоген.

Експерименти з вивчення ефективності антинематодної дії регуляторів росту проводили спочатку в умовах теплиці. Насіння рослин обробляли препаратами Регоплант, Стімпо, Біоген, в яких концентрація аверсектину становила 0,05; 0,1; 0,5; 1 та 10 мкг/мл, після чого висаджували в горшечки діаметром 10 см за температури 25±5 °С. Для зараження рослин використовували

інфекційні личинки цистоутворювальних нематод, які екстрагували із цист. Цисти цистоутворювальних нематод виділяли з ґрунту за допомогою стандартного методу вологої декантації на ситах. Виділені таким чином цисти переносили у чашки Оостенбріка та заливали насиченим розчином хлориду цинку [34]. Інкубацію цист проводили протягом 7 днів при кімнатній температурі. Личинки нематод вилловлювали із суспензії, застосовуючи сито з діаметром пор 25 мкм.

Нематоди у кількості 1000 личинок на кожен горщик вносили через два тижні після висіву обробленого регуляторами насіння, а через два тижні рослини викопували та визначали кількість личинок, що потрапили у корені. Як контроль використовували рослини, вирощені з насіння, яке не обробляли регуляторами росту. Через два тижні рослини викопували та визначали кількість інфекційних личинок, що потрапили у корені. Корені цукрових буряків акуратно промивали у проточній воді. Потім корені занурювали у розчин молочної кислоти, гліцеролу, аніліну та дистильованої води на кілька хвилин, підігрівали 2 хв у мікрохвильовій печі та висушували на повітрі. Шматочки коренів завдовжки 1,5 см поміщали у гомогенізатор. Гомогенізовані корені переносили у циліндри об'ємом 150 мл зі 100 мл води, ретельно струшували та підраховували кількість нематод, що проникли у корені.

Вплив обробки насіння регуляторами росту вивчали за показниками зменшення відсотка проникнення в корені цукрових буряків личинок нематод.

Визначення летальної концентрації LD_{50} та LD_{90} проводили в лабораторних умовах. Реєстрували смертність бурякової та галової нематод на 2-гу та 24-ту год після оброблення препаратами Регоплант і Стімпо у концентраціях аверсектину 0,05; 0,1; 0,5; 1; 10 мкг/мл. Дослід проводили на годинниковому скельці у чотирьох повтореннях. У кожне скельце вносили 500 мкл тестованої концентрації регуляторів росту та 40 личинок цистоутворювальної або галової нематоди. Личинки другого віку цистоутворювальної нематоди отримували за методикою, що була описана вище. Для виділення личинок другого віку галової нематоди використовували фільтрувальний екран з порами 20 мкм [35].

За допомогою методу молекулярної гібридизації мРНК із si/miRNA перевіряли можливість індукції регуляторами росту рослин синтезу si/miRNA з антинематодною активністю. Із цією метою насіння цукрово-

го буряку з високою схожістю пророщували у чашках Петрі на безнематодному водному середовищі (контроль) та із суспензією цист нематод, з яких у процесі інкубації при 23 °C з'являлися личинки нематод (приблизно на 5–7-й дні). У паралельних пробах додавали також композиційні препарати Регоплант, Стімпо, Біоген.

Аналогічні експерименти проводили з перевірки антипатогенної дії малих регуляторних si/miRNA залежно від рівня їх синтезу. У цих дослідах насіння ярої пшениці сорту Грізо, не оброблене (контроль) та оброблене комплексними поліфункціональними препаратами Регоплант, Стімпо, Біоген, було пророщено в чашках Петрі за температури 25+5 °C та інфіковано патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*.

Препарати si/miRNA високої чистоти із дослідних рослин виділяли за допомогою раніше розробленого нами методу [18], який передбачає такі етапи:

1) виділення сумарного препарату РНК із клітин рослин [36–38]. Полімерність виділених сумарних препаратів РНК аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-му гелі агарози у присутності 7 М сечовини за методом Локера [39] (гелі фарбували розчином етидіумброміду перед фотографуванням фракцій РНК в ультрафіолеті);

2) розділення полі(А)⁺мРНК (тобто мРНК) та полі(А)⁻мРНК на оліго(dT)-целюлозній колонці з метою подальшого використання полі(А)⁺мРНК для тестування функціональної активності si/miRNA в безклітинних системах протеїнового синтезу з проростків пшениці [36, 38];

3) осадження високомолекулярної полі(А)⁺мРНК з елюату проводили за допомогою 10%-го розчину поліетиленгліколю (мол. маса 8000) з 0,5 М NaCl, а si/miRNA – рівним об'ємом 96%-го етанолу при –22 °C впродовж доби; з колонки полі(А)⁺РНК знімали 2–3 об'ємами буфера такого складу: 10 мМ трис-НС1 (рН 7,5), 1 мМ ЕДТА, 0,05% ДДС-Na [40, 41], а після елюції з колонки полі(А)⁺мРНК осаджували етанолом;

4) молекулярна гібридизація в розчині 2xSSC низькомолекулярних si/miRNA з фракцією полі(А)⁺мРНК;

5) нанесення гібридних молекул полі(А)⁺мРНК із si/miRNA на оліго(dT)-целюлозну колонку з наступною елюцією з колонки буфером, зазначеним у пункті 3;

6) температурна (95 °C) денатурація очищених за допомогою колонки гібридних молекул полі(А)⁺мРНК із si/miRNA;

7) відокремлення полі(А)⁺мРНК від si/miRNA за допомогою методу фракціонування на оліго(dT)-целюлозній колонці;

8) повторне осадження si/miRNA 96% -м етанолом та перевірка чистоти виділених si/miRNA за допомогою електрофорезу в 15% -му поліакриламідному гелі (ПААГ-електрофорез).

Видоспецифічну сайленсингову активність si/miRNA визначали у безклітинних системах протеїнового синтезу з проростків пшениці [38].

Для дослідів із гібридизації si/miRNA, виділених з дослідних рослин, із мРНК контрольних рослин, перед одержанням si/miRNA її інтенсивно мітили *in vivo* ³³P за допомогою Na₂HP³³O₄ [36]. Для дослідів із перевірки її інгібуючої активності в безклітинних системах протеїнового синтезу використовували немічену si/miRNA [38].

Дот-блот (точкова) гібридизація ³³РкДНК з мРНК. Препарати мРНК з дослідних (оброблених регуляторами росту) рослин пшениці піддавали дот-блот-гібридизації з кДНК контрольних рослин з метою визначення відсотка гомології популяцій мРНК з дослідних і контрольних рослин [40, 41].

Для синтезу ланцюга кДНК було застосовано буферний розчин такого складу: 100 мМ трис-НСl (рН 8,3) при 42 °С, 10 мМ MgCl₂, 140 мМ КСl, 100 мкг/мл оліго(dT)₁₂₋₁₈ праймер, 2 мМ метилгідраргієвого гідроксиду, 20 мМ β-меркаптоетанолу, 1 мМ ванадилрибонуклеозидних комплексів чи 0,5 од/мкл РНКазу, 1 мМ розчин усіх чотирьох dNTP, 100 мкг/мл полі(А)⁺РНК, 400–800 од/мл зворотної транскриптази і [α-³³P]-dCTP (800 Кю/мМ) [36, 40, 41].

Для нанесення ³³РкДНК на фільтри її розчиняли в концентрації 20 мкг/мл у буфері 0,3 М NaCl — 0,03 М цитрату натрію, рН 7,0 (2XSSC) і для гібридизації наносили 1 мл розчину [³³P]-кДНК на модифіковані й активовані целюлозні фільтри (Ватман 50, 2-амінофенілтіоефірний папір, який утворює ковалентні зв'язки з нанесеними ДНК чи РНК, на відміну від звичайних целюлозних або нітроцелюлозних фільтрів, що утворюють водневі зв'язки з ДНК чи РНК). Це дозволяє уникнути втрати нуклеїнових кислот під час відмивання фільтрів [40, 42].

Для гібридизації на фільтрах кДНК з мРНК вміщували у флакони для визначення радіоактивності, наповнені розчином 2XSSC з десятикратним надлишком мРНК відносно кДНК [40, 41]. У кожному досліді в окремі флакони вміщували фільтри з ДНК із генетично віддаленого джерела для конт-

ролю на специфічність гібридизації, а також фільтри, які не містили ДНК, з метою оцінки величини неспецифічної сорбції РНК на матеріалі фільтрів. Флакони з фільтрами щільно закривали і поміщали в термостат для гібридизації.

Гібридизацію проводили при 66 °С, однак під час роботи з нуклеїновими кислотами з різних джерел брали до уваги, що молекули РНК з більш стійкою вторинною структурою (завдяки вмісту в ній більшої кількості ГЦ-пар, що може бути в сумарному препараті мРНК) потребують більш високих температур. Оптимальну температуру і максимальний рівень гібридизації підбирали, вимірюючи рівень гібридизації мРНК відповідно з гомологічною і гетерологічною кДНК. Гібридизацію порівнювали в різні часові інтервали упродовж доби.

Після закінчення гібридизації флакони з фільтрами охолоджували, фільтри виймали і промивали у воронці з кожного боку 50 мл 2XSSC. Після промивання фільтри поміщали в розчин 2XSSC, що містив РНКазу в концентрації 20 мкг/мл. Після інкубації з РНКазою за кімнатної температури протягом 1 год фільтри знов промивали розчином 2XSSC, потім етиловим спиртом. Радіоактивність проб визначали на склофільтрах Millipore AP-15 в толуольному сцинтиляторі в сцинтиляційному лічильнику LS 100С фірми Beckman.

Статистичну обробку отриманих даних проводили дисперсійним (за Стьюдентом) та кореляційно-регресійним методами.

Результати та обговорення

У проведених лабораторних, тепличних і польових дослідах було визначено, що комплексні поліфункціональні препарати Регоплант і Стімпо значно підвищують стійкість рослин до небезпечних паразитів — нематод (цистоутворювальних і галових) та патогенного гриба (фузаріозного міксоміцета).

На рис. 1 представлено фотознімки, що зроблені в польових умовах, на яких зображено інфіковані цистоутворювальною нематодою *H. schachtii* рослини цукрового буряку *Beta vulgaris L.*, а також дорослі самки та цисти цієї нематоди.

Як свідчать експериментальні дані, отримані в умовах теплиці (табл. 1), оброблення насіння регуляторами росту Регоплант і Стімпо пригнічувало проникнення личинок бурякової нематоди в корені цукрових буряків у перший місяць вегетації культури. Кількість личинок нематод, що потрапи-

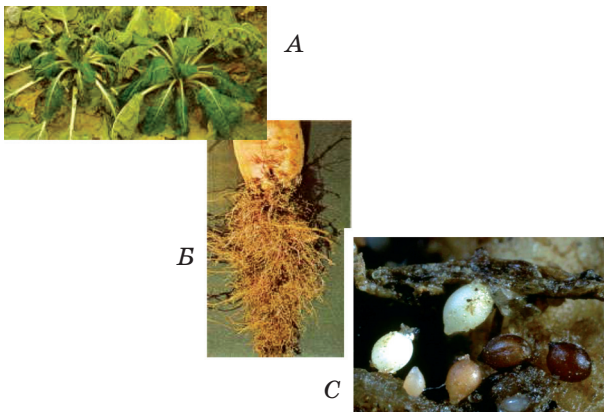


Рис. 1. Інфіковані цистоутворювальною нематодою *H. schachtii* рослини цукрового буряку *Beta vulgaris* L. та їхні уражені корені (А і В), білі й коричневі цисти нематод (С)

ли в корені під впливом Стімпо, зменшувалась на 67,8%, а Регопланта — на 72,68%. Підвищення концентрації аверсектину зменшувало чисельність личинок, що проникли в корені цукрових буряків у разі оброблення двома препаратами ($P < 0,05$). Максимальне (80%) відносно контролю зниження кількості личинок у коренях цукрових буряків спостерігали за концентрації 5 мкг/мл.

У разі оброблення Біолоном максимальне зменшення кількості личинок, що проникли в корені, становило 81% за концентрації препарату 1 мкг/мл. Встановлено, що подальше підвищення концентрації препаратів не впливало на проникнення личинок

Таблиця 1. Ефективність оброблення насіння цукрових буряків регуляторами росту проти бурякової нематоди *H. schachtii*

Препарат	Концентрація, мкг/мл	Зменшення кількості личинок, що потрапили у корені, порівняно з контролем, %
Стімпо	0,05	49,75
	0,5	70
	1	71
	5	80
	10	69
Регоплант	0,05	52
	0,5	69,7
	1	81,5
	5	80,25
	10	79,75

Примітка. НСР_{0,05} (найменша суттєва різниця) — 55.

нематод у корені. Так, у разі оброблення рослин препаратами в концентрації, яка перевищувала 10 мкг/мл, подальше зниження кількості личинок нематод, що проникли в корені цієї сільськогосподарської культури, не відбувалося (рис. 2).

Результати вивчення впливу регуляторів росту в різних концентраціях на два вказані види нематод та визначення летальних концентрацій LD₅₀ і LD₉₀ цих препаратів подано в табл. 1, а також на рис. 3 і 4. Встановлено, що існує відмінність між дією регуляторів Стімпо і Регоплант на бурякову та галову нематоди. Регоплант зумовлює 50%-ну смертність личинок галової нематоди через 2 год у концентрації, в 1,3 раза меншій, ніж Стімпо, а через 24 год — удвічі меншій. Ще більш відчутну різницю в результатах було отримано для бурякової нематоди. Через 2 год 50% личинок гинуло за концентрації регулятора росту Регоплант в 1,8 раза меншій, ніж регулятора Стімпо, а через 24 год — у 6 разів меншій.

90%-ну смертність обох видів нематод спостерігали за дії регуляторів росту Стімпо та Регопланта тільки через 24 год (табл. 2). Летальна концентрація LD₉₀ для бурякової нематоди була в 1,8 раза меншою, ніж для галової. Регоплант спричинював 90%-ну смертність личинок галової нематоди в удвічі меншій концентрації, ніж Стімпо. Для бурякової нематоди 90%-ну смертність зареєстровано в разі застосування приблизно однакової концентрації препаратів.

Таким чином, результати експериментів, проведених в умовах теплиці, свідчать про те, що під дією регуляторів росту Регоплант і Стімпо зменшується ризик проникнення та накопичення личинок фітогельмінтів у корені цукрових буряків на початку вегетації культури.

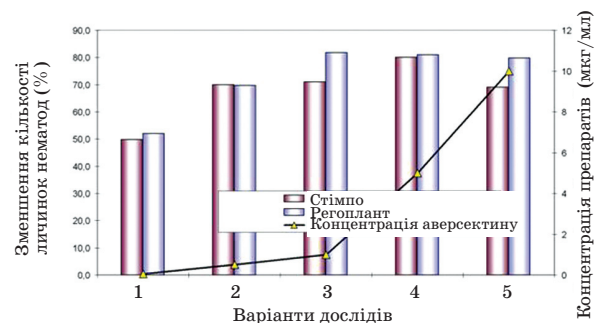


Рис. 2. Вплив оброблення насіння цукрових буряків регуляторами росту з різною концентрацією аверсектину на проникнення личинок бурякової нематоди на початку вегетації культури

Таблиця 2. Концентрація LD₅₀ і LD₉₀ регуляторів росту для бурякової та галової нематод

Препарат	Коренева цистоутворювальна нематода <i>H. schachtii</i>				Галова нематода <i>M. incognita</i>			
	LD ₅₀ (МКГ/МЛ)		LD ₉₀ (МКГ/МЛ)		LD ₅₀ (МКГ/МЛ)		LD ₉₀ (МКГ/МЛ)	
	2 год	24 год	2 год	24 год	2 год	24 год	2 год	24 год
Стімпо	3,9	0,6	–	4	1,9	1	–	7
Регоплант	2,8	0,1	–	3,9	2	0,5	–	3,8

Примітка. Середні результати з трьох дослідів.

Результати, отримані в лабораторних дослідях, свідчать про те, що галова нематода сприйнятливіша до дії регуляторів росту у першій період після оброблення ними, тимчасом як бурякова нематода стає більш сприйнятливою до дії цих регуляторів у пізніший період (рис. 3 і 4).

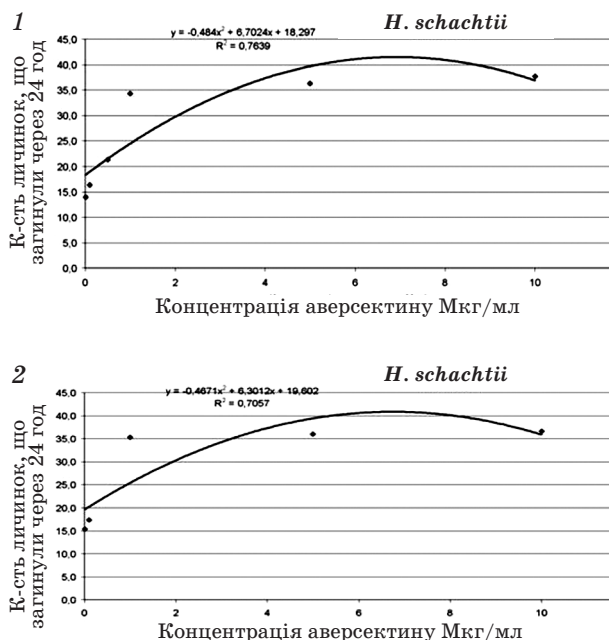


Рис. 3. Вплив регуляторів росту на личинки бурякової нематоди через 24 год після оброблення регуляторами росту: 1 — Стімпо; 2 — Регоплант

На основі даних, одержаних в умовах теплиці та в лабораторних експериментах, зроблено висновок, що Регоплант має чіткіше виражений нематоцидний ефект, ніж Стімпо.

У проведених дослідях *in vitro* було також отримано результати (морфологічні показники росту та розвитку проростків цукрового буряку), що підтверджують високу ефективність дії композиційних препаратів проти цистоутворювальної нематоди *H. schachtii*. На рис. 5 наведено фото отриманих під час вирощування на інфекційному фоні

(у присутності личинок *H. schachtii*) 5-денних проростків цукрового буряку, отриманих з обробленого регулятором росту Стімпо в концентрації 5 мкг/мл насіння (А) — дослід та необробленого регулятором росту насіння (Б) — контроль. Як видно, дослідні рослини під впливом регулятора росту Стімпо добре ростуть та розвиваються на інфекційному фоні, тоді як контрольні рослини гинуть на 5-й день після пророщування.

Проводячи молекулярно-генетичні експерименти з вивчення механізму дії композиційних препаратів, ми виходили з того, що враження організму різними типами патогенів чи паразитів індукує синтез специфічних до їхньої структури мРНК пул si/miRNA, і що регулятори росту стимулюють синтез si/miRNA, завдяки чому підвищується імунітет рослин за наведеним механізмом дії si/miRNA. Отримання відповідей на ці питання може сприяти створенню нового покоління регуляторів росту з властивостями вибіркової активації синтезу si/miRNA, специфічних до мРНК того чи іншого патогена або паразита.

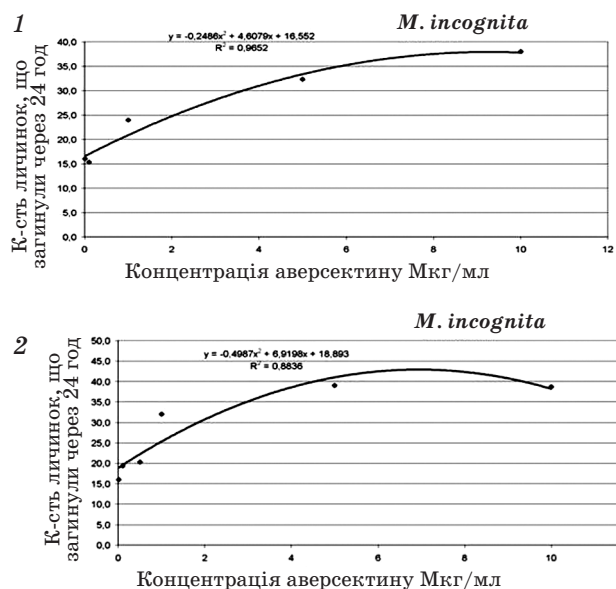


Рис. 4. Вплив регуляторів росту на личинки галової нематоди через 24 год після оброблення регуляторами росту: 1 — Стімпо; 2 — Регоплант

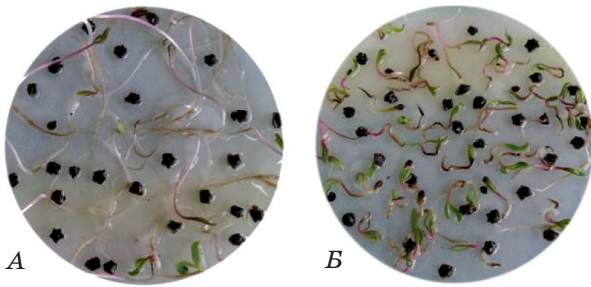


Рис. 5. 5-денні проростки цукрового буряку, вирощені на інфекційному фоні (в присутності личинок цистоутворювальної нематоди *H. schachtii*):

А — дослідні рослини, отримані з насіння, обробленого регулятором росту Стімпо в концентрації 5 мкг/мл;
 Б — рослини, отримані з не обробленого регулятором росту насіння (контроль)

Результати ПААГ-електрофорезу (рис. 6) свідчать, що отримані препарати si/miRNA високої чистоти мали розмір 21–25 нуклеотидів, що відповідає класичним параметрам цих типів РНК.

Подані в табл. 3 дані свідчать про значне підвищення синтезу власне клітинних si/miRNA за інфікування рослин цукрового буряку личинками нематод, і навпаки, про значне підвищення синтезу антинематодних si/miRNA під впливом композиційних препаратів Стімпо, Регоплант з біозахисними властивостями і, як результат, зменшення ураження нематодами клітин рослин під впливом цих препаратів.

Таблиця 3. Ступінь (%) відмінностей за рівнем гібридизації популяцій цитоплазматичних ³³P-мРНК з гомологічними si/miRNA з рослин цукрового буряку, оброблених поліфункціональними композиційними регуляторами та нематодою *H. schachtii* відносно контрольних рослин (як контроль використовували % гібридизації ³³P-мРНК з гомологічною si/miRNA з рослин, що їх не обробляли регуляторами та нематодами)

Назва регуляторів	Контроль	Відсоток аверсектинів до регуляторів	Варіанти дослідів	
			Регулятори росту	Регулятори росту + нематоди
Біоген (емістим + аверсектини)	98*	0,2	96±0,54** (2%)	86±0,46** (12%)
		2,5	94±0,72** (4%)	88±0,58** (10%)
		5,0	91±0,66** (7%)	92±0,62** (6%)
Стімпо (біолан + аверсектини)		0,2	97±0,58** (1%)	82±0,64** (16%)
		2,5	93±0,84** (5%)	84±0,72** (14%)
		5,0	92±0,62** (6%)	87±0,68** (11%)
Регоплант (радос-тим + аверсектини)		0,2	94±0,38** (4%)	86±0,48** (12%)
		2,5	92±0,73** (6%)	88±0,52** (10%)
		5,0	88±0,68** (10%)	90±0,38** (8%)

Примітки: 1. ** — Наявність достовірних відмін від контролю, $P < 0,05$, $n = 3$.

2. * — Наявність достовірних відмін власне в контролі, $P < 0,05$, $n = 3$.

3. Ступінь (%) відмінностей вивчали за допомогою методу дот-блот-гібридизації. У дослідях використовували 7-денні проростки цукрового буряку; в дослідні проби (чашки Петрі) додавали 20 мкл розчину кожного з композиційних препаратів регуляторів росту. Практично всі проростки буряку, оброблені нематодами без регуляторів росту, гинули на 5-й день інкубації.

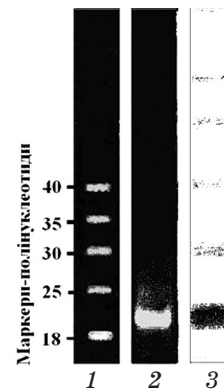


Рис. 6. ПААГ-електрофорез si/miRNA з проростків цукрового буряку: маркерні полінуклеотиди (цифрами позначено довжину в нуклеотидах) та препарат si/miRNA на доріжках гелю (відповідно 1 та 2) були насичені етидіумбромідом; радіоавтограф ³³P мічених si/miRNA з гелю (доріжка 3)

У проведених лабораторних дослідях з визначення сортоспецифічної дії композиційних препаратів з біозахисними властивостями (Біоген, Стімпо, Регоплант) на різних сортах озимої пшениці (Ятрань 60, Володарка, Смуглянка та Подольська) досліджували фізіологічні та морфогенетичні показники росту та розвитку: енергії проростання насіння, густини проростків, швидкості росту, довжини й об'єму кореневої системи та надземної частини — стебла і листків проростків, стійкості проростків рослин до полягання.

Визначення відсотка гомології у популяціях (наборах) цитоплазматичних мРНК-транскриптів, через які геном реалізує програму синтезу структурних та функціональних елементів, процеси росту й розвитку рослин упродовж усього їх онтогенезу, методом дот-блот-гібридизації P³³-кДНК одного сорту з мРНК всіх інших сортів показало достовірні відмінності в популяційних складах («спектрах»), а також різницю в змінах популяційних показників мРНК у сортів під впливом композиційних препаратів регуляторів росту (табл. 4).

Одержані результати щодо відмінностей (різниці) в інтегральних фізіологічних та морфогенетичних показниках проростків різних сортів пшениці разом із зазначеними молекулярно-генетичними відмінностями, а також раніше встановленими нами кардинальними сортовими відмінностями у співвідношенні (балансі) фітогормонів та під впливом регуляторів росту [1], свідчать про наявність можливо незворотних процесів перепрограмування геномів у досліджених сортів, а також зворотних процесів під впливом зовнішніх регуляторних чинників (за різними механізмами обох процесів).

Однією з можливостей виявлених сортових різниць може бути перегрупування (перепрограмування) генів і виключення з роботи (наприклад, в результаті мутації під час створення сортів) активних генів, що функціонували у вихідних батьківських формах рослин, та включення раніше неактивних, але близьких за функцією генів у мультигенних сімействах або суперсімействах генів, у яких кожен член (варіант) сімейства дещо відрізняється за нуклеотидною послідовністю в регуляторних, кодуювальних та некодуювальних ділянках в їхніх структурах, має різні призначення в адаптаційних процесах і регулюється різними факторами [37]. Таку можливість підтверджують і одержані нами результати за рівнем пригнічення біосинтезу поліпептидів у безклітинних системах протеїнового синтезу малими регуляторними РНК (si/miRNA), ізольованими з різних сортів пшениці (рис. 7). Сукупність цих результатів слугуватиме основою для подальшого визначення молекулярно-генетичних механізмів відмінностей у чутливості різних сортів озимої пшениці до регуляторів росту рослин.

Таблиця 4. Ступінь (%) відмінностей популяційних характеристик цитоплазматичних мРНК різних сортів озимої пшениці, що були не оброблені й оброблені регуляторами росту з біозахисними властивостями

Сорти пшениці	Відсоток гібридизації кДНК сорту Ятрань 60 з гомологічною (контроль) та з гетерологічними (досліди) мРНК	Регулятори росту								
		Біоген (емістим + аверсектини)			Стімпо (біолан + аверсектини)			Регоплант (радостим + аверсектини)		
		0,2	2,5	5,0	0,2	2,5	5,0	0,2	2,5	5,0
Ятрань 60	98±0,63*	96±0,48** (2%)	94±0,44** (4%)	91±0,54** (7%)	97±0,62** (1%)	96±0,46** (2%)	94±0,72** (4%)	96±0,42** (2%)	93±0,46** (5%)	91±0,76** (7%)
Володарка	89±0,56** (11%)	97±0,82** (1%)	86±0,78** (12%)	88±0,47** (10%)	90±0,48** (8%)	86±0,66** (12%)	84±0,54** (14%)	86±0,58** (12%)	84±0,98** (14%)	82±0,8** (16%)
Смуглянка	91±0,52** (9%)	88±0,96** (10%)	87±0,63** (11%)	82±0,43** (16%)	88±0,56** (10%)	90±0,54** (8%)	86±0,48** (12%)	87±0,76** (11%)	88±0,84** (10%)	84±0,78** (14%)
Подоланка	83±0,78** (15%)	82±0,65** (16%)	79±0,74** (19%)	78±0,86** (20%)	77±0,68** (21%)	81±0,53** (17%)	76±0,84** (22%)	80±0,68** (18%)	77±0,82** (21%)	75±0,96** (23%)

Примітки: 1. ** — Достовірність відмінностей від контролю, P < 0,05, n = 3.

2. Ступінь (%) відмінностей вивчали за допомогою методу дот-блот-гібридизації. У дослідях використовували 7-денні проростки пшениці, у дослідні проби (чашки Петрі) додавали по 20 мкл розчину кожного з композиційних препаратів регуляторів росту, цифрові значення 0,2; 2,5; 5,0 — % аверсектинів відносно регуляторів росту.

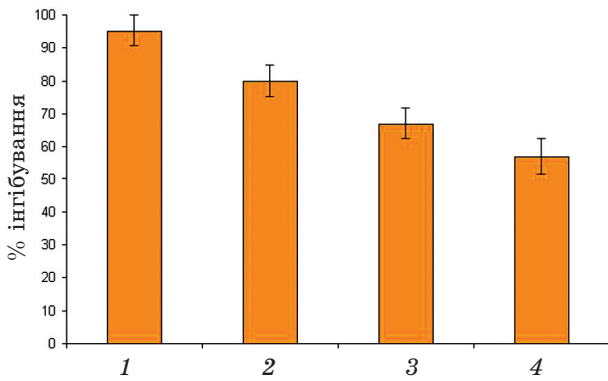


Рис. 7. Відсоток інгібування в безклітинних системах протеїнового синтезу із проростків пшениці біосинтезу поліпептидів на матрицях мРНК з клітин сортів озимої пшениці Ятрань 60 за допомогою малих регуляторних РНК (si/miRNA), ізольованих з клітин пшениці сортів: Ятрань 60 (1); Володарка (2); Смуглянка (3) та Подольянка (4)

Як було показано, спостерігається наявність залежності від структури сортової специфічності сайленсорної (інгібувальної) дії si/miRNA на процеси трансляції мРНК сортів.

У ході експериментів з вивчення молекулярно-генетичних механізмів антипатогенної дії регуляторів росту ми враховували

отримані раніше в польових умовах дані [1, 17] про значне підсилення захисних властивостей різних сортів ярої пшениці сорту Грізо до патогенного мікроміцета *Fusarium oxysporum graminearum*.

У лабораторних дослідах, проведених на оброблених регуляторами росту з біозахисними сполуками (Біоген, Стімпо, Регоплант) рослинах ярої пшениці сорту Грізо, було отримано результати, які свідчать про різке підвищення стійкості цих рослин (до 35–70%) до патогенного мікроміцета *Fusarium oxysporum graminearum*. Методом дот-блот-гібридизації препаратів цитоплазматичних мРНК (через κДНК) і попереднім визначенням гормонального складу у контрольних та дослідних рослин [17] встановлено, що підвищення врожайності та стійкості культур до шкідників пов'язано із суттєвими змінами популяційних характеристик (наборів) мРНК та малих регуляторних si/miRNA, можливо, за рахунок вибіркового переключення активності генів у відповідних мультисімействах генів (табл. 5).

Таким чином, за допомогою молекулярно-генетичного методу дот-блот-гібридизації вперше встановлено різницю в популяційних характеристиках si/miRNA між

Таблиця 5. Ступінь (%) відмінностей за рівнем гібридизації популяцій цитоплазматичних P³³-мРНК з гомологічною si/miRNA з проростків ярої пшениці сорту Грізо, що були вирощені з насіння, обробленого регуляторами росту та мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*, відносно контрольних (одномісячних) рослин (як контроль використовували % гібридизації P³³-мРНК з гомологічною si/miRNA з рослин, не інфікованих патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum* та мікроміцетом *Fusarium oxysporum*)

Назва регуляторів	Контроль	Відсоток аверсектинів до регуляторів	Варіанти дослідів	
			Рослини, оброблені регуляторами росту	Рослини, інфіковані <i>Fusarium oxysporum graminearum</i> та оброблені регуляторами росту
Біоген (емістим + аверсектини)	98*	0,2	95±0,54**(3%)	82±0,46**(18%)
		2,5	92±0,72**(6%)	88±0,58**(10%)
		5,0	91±0,66**(7%)	92±0,62**(6%)
Стімпо (біолан + аверсектини)		0,2	97±0,58**(1%)	80±0,64**(18%)
		2,5	93±0,84**(5%)	89±0,72**(9%)
		5,0	90±0,62**(8%)	90±0,68**(8%)
Регоплант (радостим + аверсектини)		0,2	94±0,38**(4%)	86±0,48**(12%)
		2,5	89±0,73**(9%)	90±0,52**(8%)
		5,0	87±0,68**(11%)	92±0,38**(6%)

Примітки: 1. ** — Наявність достовірних відмін від контролю, $P < 0,05$, $n = 3$.

2. * — Наявність достовірних відмін власне в контролі, $P < 0,05$, $n = 3$.

3. Ступінь (%) відмінностей вивчали за допомогою методу дот-блот-гібридизації. У дослідях використовували дорослі (2-місячні) рослини ярої пшениці сорту Грізо, вирощені з насіння, що його не обробляли та обробляли регуляторами росту на інфекційному фоні з мікроміцета *Fusarium oxysporum graminearum*.

контрольними проростками цукрового буряку та рослинами, що їх обробляли композиційними препаратами — регуляторами росту з біозахисними властивостями, а також рослинами, що їх обробляли регуляторами на штучно створеному нематодою *H. schachtii* інфікованому фоні. Результати свідчать про існування гнучкої системи перепрограмування геному клітин рослин під дією різних зовнішніх регуляторних чинників.

Суттєві зміни в популяційних характеристиках si/miRNA проростків рослин ярої пшениці сорту Грізо виявили, визначаючи відсоток гомології si/miRNA до мРНК у до-

рослих рослин, вирощуваних з насіння, обробленого регуляторами росту рослин, не інфікованих та інфікованих мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*. При цьому спостерігали зміни, що залежали від концентрації регуляторів росту.

Уперше встановлено також популяційні, залежні від дози регуляторів росту, сортові відмінності цитоплазматичних мРНК рослин пшениці методом дот-блот-гібридизації та з використанням безклітинної системи протейнового синтезу, які можна пояснити генетичною природою різної стійкості сортів рослин до біотичних та абіотичних зовнішніх чинників.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пономаренко С. П., Терек О. И., Грицаенко З. М. и др. Биорегуляция роста и развития растений. — Глава 4 монографии «Биорегуляция микробно-растительных систем» / Под. ред. Иутинской Г. А. и Пономаренко С. П. — К.: Ничлава, 2010. — 464 с.
2. Fuller V. L., Lilley C. J., Urwin P. E. Nematode resistance // *New Phytol.* — 2008. — V. 180. — P. 27–44.
3. Зиновьева С. В. Молекулярные механизмы взаимодействия растений и паразитических нематод: теоретические и прикладные аспекты / Паразитические нематоды растений и насекомых (К 50-летию фитопаразитологических исследований в Институте паразитологии РАН). — М.: Наука, 2004. — С. 50–85.
4. Чижов В. Н. Диагностика галловых нематод рода *Meloidogyne* (Nematoda: Tylenchida) в защищенном грунте / Там же. — М.: Наука, 2004. — С. 253–276.
5. Stevens M., May M. J. Pests, diseases and weeds review 2009 // *British Sugar Beet Review.* — 2010. — V. 78, N 1. — P. 7–10.
6. Стефановская Т. Р. Агроэкологическое обоснование регуляции численности комплекса нематод сахарной свеклы.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1992. — 29 с.
7. Stefanovska T., Pidlisnyuk V. Challenges to grow oilseed rape *Brassica napus* in sugar beet rotations // *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* — 2009. — V. 74, N 2. — P. 573–579.
8. Faske T. R., Starr J. L. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Abamectin // *J. Nematol.* — 2006. — V. 38, N 22. — P. 240–244.
9. Garabedian S., Van Gundy S. D. Use of avermectins for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes // *Ibid.* — 1983. — V. 15. — P. 503–519.
10. Jansson R. K., Rabatin S. Curative and residual efficacy of injection applications of avermectins for control of plant-parasitic nematodes on banana // *Ibid.* — 1997. — V. 29. — P. 695–702.
11. Faske T. R., Starr J. L. Cotton root protection from plant-parasitic nematodes by abamectin-treated seed // *Ibid.* — 2007. — V. 39. — P. 27–30.
12. Nordmeyer D., Dickson D. W. Management of *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria*, and *M. incognita* on flue-cured tobacco with organophosphate, carbamate, and avermectin nematicides // *Plant Disease.* — 1985. — V. 69. — P. 67–69.
13. Roberts P. A., Matthews W. C. Disinfection alternatives for control of *Ditylenchus dipsaci* in garlic seed cloves // *J. Nematol.* — 1995. — V. 27. — P. 448–456.
14. Monfort W. S., Kirkpatrick T. L., Long D. L., Rideout S. Efficacy of a novel nematicidal seed treatment against *Meloidogyne incognita* on cotton // *Ibid.* — 2006. — V. 38, N 2. — P. 245–249.
15. Білявська Л. О., Козирицька В. Є., Валагурова В. О., Іутинська Г. О. Аверком — новий вітчизняний препарат нематоцидної і фітостимулюючої дії // Сільськогосподарська мікробіологія (Міжвід. тематич. наук. збірник). — Чернівці: ЦНТЕІ, 2008. — Вип. 7. — С. 22–29.
16. Іутинська Г. А., Валагурова В. Є., Козирицька В. Є. и др. Аверком — новий антипаразитарний препарат. — Глава 1 монографії «Биорегуляция микробно-растительных систем» / Под. ред. Иутинской Г. А. и Пономаренко С. П. — К.: Ничлава, 2010. — 464 с.
17. Tsygankova V. A., Galkin A. P., Galkina L. O. et al. Gene expression under regulators' stimulation of plant growth and development. — Chapter 3 of the Monograph «New

- plant growth regulators: basic research and technologies of application» / Ed. Ponomarenko S. P., Iutynska H. O. — K.: Nichlava, 2011. — 211 p.
18. Циганкова В. А., Андрусевич Я. В., Блюм Я. Б. Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/miRNA з антинематодною активністю // Доп. АН України. — 2011. — № 9. — С. 159–164.
 19. Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // *Genes Dev.* — 2001. — V. 15. — P. 188–200.
 20. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // *EMBO J.* — 2002. — V. 21, N 17. — P. 4671–4679.
 21. Lee Y., Ahn C., Han J. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing // *Nature.* — 2003. — V. 425. — P. 415–419.
 22. Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S. et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // *Genes Dev.* — 2002. — V. 16. — P. 720–728.
 23. Leung R. K. M., Whittaker P. A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics // *Pharmacol. Therap.* — 2005. — N 107. — P. 222–239.
 24. Aravin A., Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579. — P. 5830–5840.
 25. Bakhetia M., Charlton W. L., Urwin P. E. et al. RNA interference and plant parasitic nematodes // *Trends Plant Sci.* — 2005. — V. 10, N 8. — P. 362–367.
 26. Gheysen G., Vanholme B. RNAi from plants to nematodes // *Trends Biotechnol.* — 2006. — V. 25, N 3. — P. 89–92.
 27. Knox D. P., Geldhof P., Visser A., Britton C. RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? // *Trends Parasitol.* — 2007. — V. 23, N 3. — P. 105–107.
 28. Jian X., Zhang L., Li G. et al. Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. // *Genomics.* — 2010. — V. 95. — P. 47–55.
 29. Chen R., Hu Z., Zhang H. Identification of microRNAs in wild soybean (*Glycine soja*) // *J. Integrat. Plant Biol.* — 2009. — V. 51, N 12. — P. 1071–1079.
 30. Park W., Li J., Song R. et al. 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 // *Curr. Biol.* — 2002. — V. 12. — P. 1484–1495.
 31. Llave C., Kasschau K. D., Rector M. A., Carrington J. C. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants // *Plant Cell.* — 2002. — V. 14. — P. 1605–1619.
 32. Padmanabhan Ch., Zhang X., Jin H. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2009. — V. 12. — P. 465–472.
 33. Yang T., Xue L., An L. Functional diversity of miRNA in plants // *Plant Sci.* — 2007. — V. 172. — P. 423–432.
 34. Oostenbrink M. Estimating nematode populations by some elected methods. *Nematology* / Ed. by Sasser J.N., Jenkins W.R. — Chapel Hill, NC: University of North Carolina Press, 1960. — P. 85–102.
 35. Vrain T.C. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula // *J. Nematol.* — 1977. — V. 9. — P. 249–251.
 36. Tsygankova V. A., Blume Ya. B. et al. An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracil // *Biopolymers and cell.* — 1998. — V. 14, N 5. — P. 438–448.
 37. Tsygankova V. A. Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period // *Біотехнологія.* — 2010. — Т. 3, № 4. — С. 86–95.
 38. Tsygankova V. A., Musatenko L. I., Ponomarenko S. P. et al. Change of functionally active cytoplasmic mRNA populations in plant cells under growth regulators action and biological perspectives of cell-free systems of protein synthesis // *Там само.* — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 19–32.
 39. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea // *Anal. Biochem.* — 1979. — V. 98, N 2. — P. 358–367.
 40. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual.* — New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982. — 480 p.
 41. *Promega protocols and applications guide. Second edition.* — USA: Promega Corporation, 1991. — 422 p.
 42. *Методи біології розвитку* / Под ред. Деллафа Т. А., Бродского В. Я., Гаузе Г. Г. — М.: Наука. — 1974. — 619 с.

**ИНДУКЦИЯ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА
БИОСИНТЕЗА si/miРНК
С АНТИПАТОГЕННЫМИ
И АНТИПАЗИТАРНЫМИ СВОЙСТВАМИ
В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ**

*В. А. Цыганкова*¹
*Т. Р. Стефановская*²
*Я. В. Андрусевич*¹
*С. П. Пономаренко*³
*А. П. Галкин*⁴
*Я. Б. Блюм*⁴

¹Институт биоорганической химии
и нефтехимии НАН Украины, Киев

²Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

³Межведомственный научно-технологический
центр «Агробиотех» НАН и МОН Украины,
Киев

⁴Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины, Киев

E-mail: vTsygankova@ukr.net

В условиях лабораторных экспериментов показано, что композиционные поликомпонентные препараты с биозащитными свойствами Биоген, Стимпо и Регоплант по показателям прорастания и скорости роста проростков существенно повышают устойчивость растений (до 35–70%) сахарной свеклы к корнепаразитирующей нематоды *Heterodera schachtii* и галловой нематоды *Meloidogyne incognita*, а также яровой пшеницы к патогенному микромицету *Fusarium oxysporum graminearum*. Установлено, что максимальное уменьшение (~80%) количества личинок нематоды *H. schachtii* в корнях сахарной свеклы происходит при обработке семян регуляторами роста в наиболее эффективных концентрациях: Стимпо — 5 мкг/мл, Регоплант — 1 мкг/мл и Биоген — 1 мкг/мл.

С помощью дот-блот-гибридизации мРНК с кДНК и исследованием функциональной активности si/miRNA в бесклеточной системе протеинового синтеза впервые показано, что устойчивость растений сахарной свеклы к нематодам *H. schachtii* и *M. incognita*, а также растений яровой пшеницы к патогенному микромицету *Fusarium oxysporum graminearum* достигается путем стимуляции синтеза малых регуляторных si/miРНК.

Ключевые слова: регуляторы роста растений, малые регуляторные РНК (si/miRNA), устойчивость растений к вредителям, бесклеточная система протеинового синтеза из проростков пшеницы.

**INDUCTION OF si/miRNA BIOSYNTHESIS
WITH ANTIPATHOGENIC
AND ANTIPARASITIC PROPERTIES
BY GROWTH REGULATORS
IN PLANT CELLS**

*V. A. Tsygankova*¹
*T. R. Stefanovska*²
*Ya. V. Andrusevich*¹
*S. P. Ponomarenko*³
*A. P. Galkin*⁴
*Ya. B. Blume*⁴

¹Institute of Bioorganic Chemistry and
Petrochemistry of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National University of Life and Environmental
Science of Ukraine, Kyiv

³National Enterprise Interdepartmental Science
& Technology Center «Agrobiotech» of National
Academy of Sciences and MES of Ukraine, Kyiv

⁴Institute of Food Biotechnology and Genomics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: vTsygankova@ukr.net

It was shown in laboratory experiments that compositional polycomponential preparations with bioprotective properties Biogen, Stimpo and Regoplant according to indexes of sprouting and speed of sprout growth considerably increase resistance (to 35–70%) of sugar beet plants to parasitic nematode *Heterodera schachtii* and root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and spring wheat to pathogenic micromycete *Fusarium oxysporum graminearum*. It was revealed that maximal reduction (on 80%) of *H. schachtii* larvae amount in the sugar beet roots takes place at application of growth regulators in the most effective concentrations: Stimpo — 5 µg/ml, Regoplant — 1 µg/ml and Biogen — 1 µg/ml.

Using DOT-blot hybridization of si/miRNA with mRNA and testing inhibitory activity si/miRNA in cell free system protein biosynthesis is set that resistance of sugar beet against parasitic nematodes *H. schachtii* and *M. incognita* as well as resistance of spring wheat to pathogenic micromycete *Fusarium oxysporum* are reached through enhancement of synthesis of small regulatory si/miRNA.

Key words: plant growth, regulators, small regulatory RNA (si/miRNA), plant resistance to wreckers, cell-free system of wheat germ protein-synthesis.