

БУЗІАШВІЛІ А.Ю.^{1✉}, БРИЛЕНКО Г.С.², ЄМЕЦЬ А.І.¹¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, ORCID: 0000-0002-8283-5401, 0000-0001-6887-0705

² Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Т. Шевченка,

Україна, 02000, м. Київ, просп. Акад. Глушкова, 2

✉ buziashvili.an@gmail.com, (095) 302-89-30

РІСТ-СТИМУЛЮЮЧА АКТИВНІСТЬ АВЕРМЕКТИН-ВМІСНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ЛІНІЇ ТОМАТІВ В УМОВАХ *IN VITRO*

Мета. Отримання ліній томатів сортів Money Maker та Лагідний у присутності поліфункціональних біопрепаратів Аверком та Аверком Нова, цитологічний аналіз ефектів впливу препаратів на клітини коренів томатів.

Методи. Сім'ядольні листки 10–11-добових проростків томатів культивували протягом 1–3 місяців на живильному середовищі МСТ за наявності 1 мг/л зеатину, 1 мг/л індоліл-оцтової кислоти та 25 мкл/л препаратів Аверком або Аверком Нова, після чого регенеровані лінії вирощували протягом 1 місяця на середовищі МСТ із додаванням препаратів. Корені рослин томатів фіксували у розчині етанолу із льодяною оцтовою кислотою (3:1), фарбували в 1% розчині ацетоорсеїну та досліджували за збільшення х600. **Результати.** Отримано лінії рослин томатів, вирощених за наявності препаратів Аверком та Аверком Нова та з'ясовано, що мітотичний індекс (МІ) у клітинах їх кореневих апексів становив 0,76–1,23% та був вищий, ніж у контрольних лініях (0,65–0,9%). Крім того, під час порівняння з контрольними лініями було виявлено потовщення клітинної стінки у клітинах коренів рослин, вирощених за наявності біопрепаратів. **Висновки.** Рослини томатів, вирощені за наявності біопрепаратів Аверком та Аверком Нова, характеризуються не лише підвищеним МІ в меристематичних клітинах кореневих апексів, але й потовщенням клітинної стінки клітин коренів, що може вказувати на ріст-стимулюючий вплив біопрепаратів та їх потенціал щодо підвищення стійкості рослин до дії стресових факторів.

Ключові слова: *Solanum lycopersicum*, *Streptomyces avermitilis*, авермектинвмісні поліфункціональні препарати, Аверком, Аверком Нова.

На сьогоднішній день актуальною є проблема зниження продуктивності сільськогоспо-

дарських культур та виснаження ґрунтів внаслідок нераціонального та науково необґрунтованого вживання хімічних засобів захисту (пестицидів), недотримання фітосанітарних норм та агротехнологічних заходів. У результаті цього ґрунт втрачає фізичні, хімічні та біологічні характеристики (щільність, проникність, баланс поживних речовин, знижується кількість та різноманітність сприятливих мікроорганізмів), що негативно впливає на стійкість рослин до дії стресових факторів навколишнього середовища, зокрема хвороб та шкідників [1]. Окрім того, інтенсивне використання хімічних засобів захисту рослин призводить до забруднення навколишнього середовища та рослинної продукції залишками хімікатів та формування стійких рас фітопатогенних мікроорганізмів [2]. Альтернативою застосуванню засобів хімічного захисту рослин є використання біопрепаратів на основі ґрунтових бактерій, що підвищують системну стійкість рослин до несприятливих біотичних та абіотичних факторів. Саме такими препаратами є Аверком та Аверком Нова, створені на основі штаму *Streptomyces avermitilis* IMV Ac-5015. Названим препаратам властива комбінована біологічна активність, яка безпосередньо спрямована на різноманітні фітопатогени та на підвищення стійкості рослин до біотичних та абіотичних факторів [3]. Препарати були отримані шляхом етанольної екстракції біомаси штаму *S. avermitilis* IMV Ac-5015, що продукує у великій кількості комплекс макролідних антибіотиків авермектинів (A1a, A2a, B1a, B2a, A1B, A2B, B1B, B2B), які мають нематицидну, інсектицидну, акарицидну та, за найновішими даними, антибактеріальну та фунгістатичну активність [2–5], але вплив авермектинів та препаратів на їх основі на рослини є недостатньо дослідженим. Окрім авермектинів, до складу препаратів Аверком та Аверком Нова входить також ряд біологічно активних речовин: фітогормонів,

© БУЗІАШВІЛІ А.Ю., БРИЛЕНКО Г.С., ЄМЕЦЬ А.І.

амінокислот та ліпідів. Завдяки комплексному складу біопрепарати Аверком та Аверком Нова не лише інгібують ріст та викликають загибель хвороботворних мікроорганізмів та шкідників, але й стимулюють ріст, розвиток та імунітет різних видів рослин [2; 3]. Оскільки томати (*Solanum lycopersicum* L.) є однією з найбільш важливих для економіки України овочевих культур, які вирощують для внутрішніх потреб та на експорт [6], метою пропонованої роботи було отримання ліній рослин томатів сортів Money Maker та Лагідний в умовах *in vitro* за наявності 25 мкл/л препаратів Аверком та Аверком Нова та аналіз впливу препаратів на клітинному рівні.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Насіння томатів сортів Money Maker та Лагідний стерилізували за описаною раніше методикою із незначними модифікаціями [6] протягом 2 хв у 70% етанолі, 15 хв у 5% гіпохлориті натрію, 15 хв у 30% пероксиді водню, тричі по 10 хв відмивали у стерильній дистильованій воді та висаджували по 20–30 насінин на стерильне живильне середовище МСТ [6], що містило 4.3 г/л мікро- та макросолей МС [7], 30 г/л сахарози, 2 мг/л гліцину, 1 мг/л тіаміну, 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 100 мг/л міоїнозиту, 8 г/л агару, рН 5.7. Насіння пророщували протягом 10–11 діб за температури 24°C за 16-годинного фотоперіоду до утворення проростків висотою 1–1,5 см.

Отримання ліній томатів, вирощених за присутності препаратів Аверком та Аверком Нова. Для отримання ліній томатів шляхом соматичного ембріогенезу із 10–11-добових проростків виділяли сім'ядольні листки та висаджували їх на контрольне середовище МСТ, що містило лише 1 мг/л зеатину та 1 мг/л індолілової кислоти (ІОК) [6], та середовище МСТ із додаванням зазначених фітогормонів та препаратів Аверком або Аверком Нова у концентрації 25 мкл/л. Експланти висаджували приблизно по 30 шт на 1 чашку Петрі та культивували протягом 1–3 місяців до появи регенерованих пагонів. Кожні 2–3 тижні експланти пересаджували на свіже середовище МСТ із додаванням фітогормонів та біопрепаратів у відповідних концентраціях. Регенеровані пагони контрольних ліній томатів відділяли від експлантів та переносили у стерильний посуд із середовищем МСТ без додавання препаратів, а регенеранти, отримані на середовищах із додаванням Авер-

кому або Аверкому Нова, відповідно висаджували на середовище МСТ із додаванням біопрепаратів. Отримані лінії мікроклонально розмножували та пересаджували на свіже середовище кожні 3–4 тижні.

Цитологічний аналіз дії препаратів Аверком та Аверком Нова на меристематичні клітини коренів томатів. Для цитологічного аналізу ізолювали корені рослин томатів, які вирощували протягом 1 місяця на відповідних середовищах з 25 мкл/л Аверкому або Аверкому Нова. Ізольовані корені фіксували протягом 1 год у розчині етилового спирту та льодяної оцтової кислоти (3:1) і тричі відмивали по 15 хв у 72% етанолі. Далі за стандартною методикою корені фарбували 1% ацетоорсеїном у 45% оцтової кислоти, тимчасові давлені препарати готували у 45% молочній кислоті [8]. Для оцінки впливу препаратів на меристематичні клітини кореневого апексу обраховували мітотичний індекс (МІ) як відношення кількості клітин на різних стадіях мітозу (профаза, метафаза, анафаза, телофаза) до загальної кількості досліджуваних клітин, помножену на 100%. Підрахунок клітин проводили використанням мікроскопа Ахioskop 40 із вбудованою фотокамерою («Carl Zeiss», Німеччина) за х600-кратного збільшення, об'єм вибірки для кожного зразка складав не менше 1000 клітин. Морфологію клітин аналізували на мікрофотографіях, зроблених за допомогою програмного забезпечення AxioVision LE 4.8.2.0 («Carl Zeiss MicroImaging GmbH», Німеччина, 2010). Кожну лінію аналізували не менш ніж 3 рази, статистичну достовірність підтверджували за допомогою критерію Стьюдента для 5% рівня значущості.

Результати та обговорення

Отримання ліній томатів, вирощених у присутності препаратів Аверком та Аверком Нова. Через 3 місяці культивування експлантів томатів сортів Money Maker та Лагідний на середовищах для регенерації було отримано 10 контрольних ліній томату сорту Money Maker, які культивували на середовищі МСТ без додавання препаратів, 21 лінію, які культивували на середовищі МСТ із додаванням Аверкому, 47 ліній, які регенерували у присутності препарату Аверком Нова, а також 8, 14 та 69 ліній томату сорту Лагідний, які регенерували на контрольному середовищі МСТ та на середовищі МСТ із додаванням біопрепаратів Аверком або Аверком Нова. Для кожного із зразків для подальшо-

го аналізу було відібрано по 3 лінії рослин, які мали нормальну морфологію, що не відрізнялася від контролю (рис. 1).

Цитологічний аналіз клітин кореневих апексів рослин томатів, вирощених у присутності препаратів Аверком та Аверком Нова. Визначення мітотичного індексу клітин меристеми коренів у модельної рослини *Allium cepa* є широко вживаним методом аналізу впливу різних типів сполук на рослинні клітини (наприклад, солей важких металів, органічних синтетичних сполук тощо [9]), тому цей метод було використано для дослідження впливу біопрепаратів Аверком та Аверком Нова на клітини томатів досліджуваних сортів Money Maker та Лагідний. Для проведення такого дослідження було обрано саме ці сорти томатів, оскільки Money Maker є модельним сортом для молекулярно-генетичних та біотехнологічних досліджень, а сорт Лагідний – український сорт-стандарт врожайності, вмісту поживних речовин та мікроелементів [6]. Найбільшу кількість мітотичних клітин спостерігали у зразках коренів, ізольованих з 8 по 9 год ранку, – для багатьох ви-

дів рослин у такий часовий проміжок характерне підвищення інтенсивності мітозу (рис. 2) [8]. При цьому найвищий МІ (1,23% – для томату сорту Лагідний, 1,03% – для сорту Money Maker) спостерігали у ліній томатів, вирощених у присутності препарату Аверком Нова, дещо нижчий (1,16% – для сорту Лагідний, 0,76% – для сорту Money Maker) – у присутності Аверкому, а найнижчий МІ (0,9% та 0,65%) – у контрольних лініях (рис. 3).

Слід зазначити, що в різних видів рослин МІ може суттєво відрізнятися і складати від 0,4% до 6–7% [10–12]. У нашій роботі значення МІ у досліджуваних сортів томату не перевищувало 1,3%, що можна пояснити також впливом вирощування рослин в асептичних умовах (*in vitro*). Водночас нами встановлено підвищення МІ у клітинах кореневого апексу у лініях томатів, які вирощували у присутності біопрепаратів Аверком та Аверком Нова, у порівнянні із контролем, що вказує на стимулюючу ріст активність обох поліфункціональних стимуляторів.

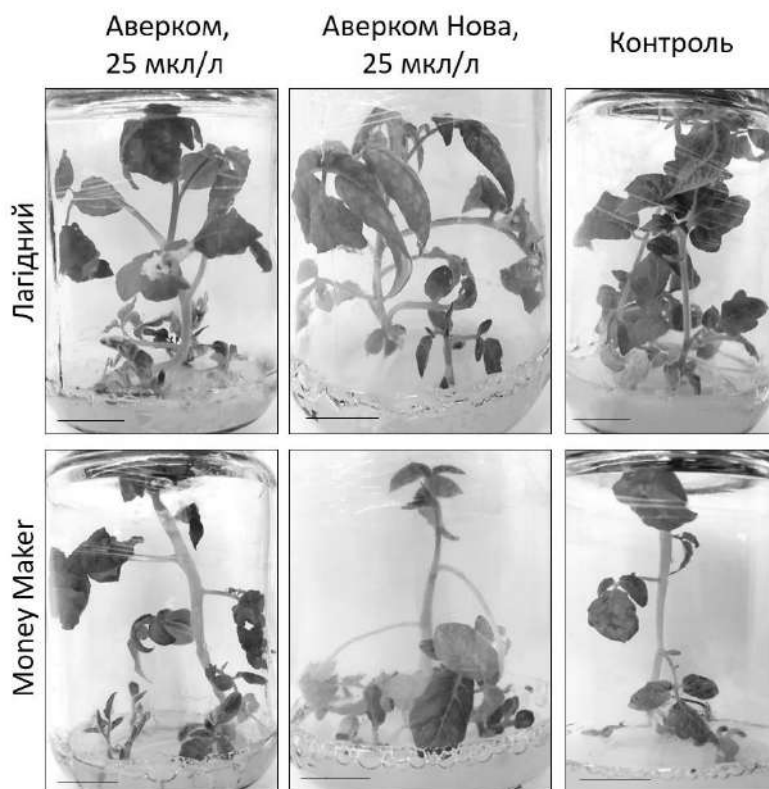


Рис. 1. Проростки томатів сортів Money Maker та Лагідний, які культивували протягом 1 місяця на середовищі MST без додавання препаратів (контроль) або із додаванням 25 мкл/л Аверкому або Аверкому Нова. Масштабна відмітка: 2 см.

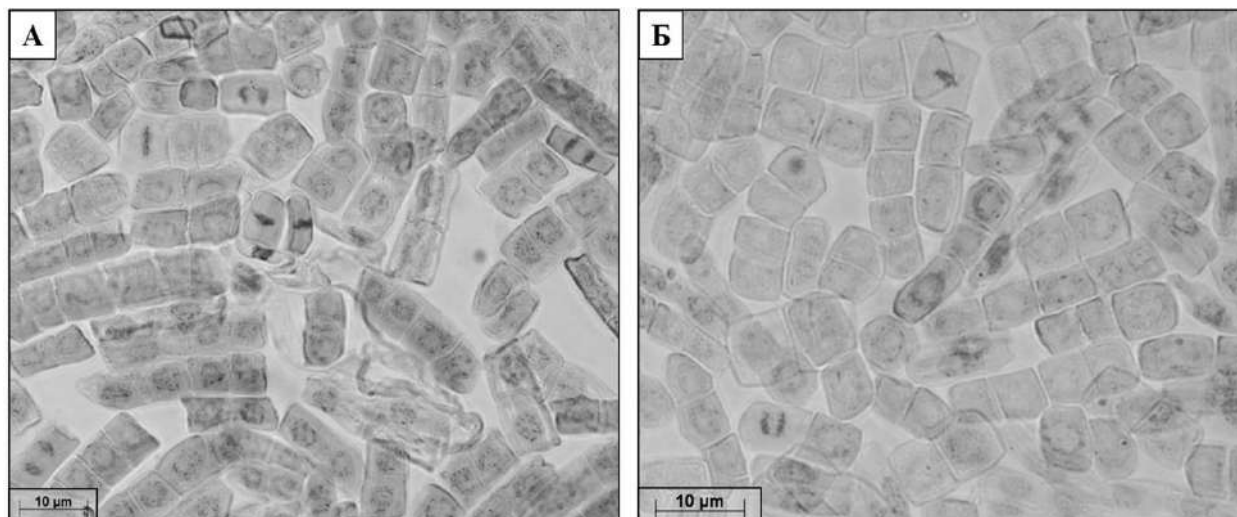


Рис. 2. Клітини апікальної меристеми коренів томатів сорту Лагідний, вирощених на середовищі МСТ із додаванням препаратів Аверком або Аверком Нова (А) та без додавання препаратів (Б). Масштабна відмітка: 10 мкм.

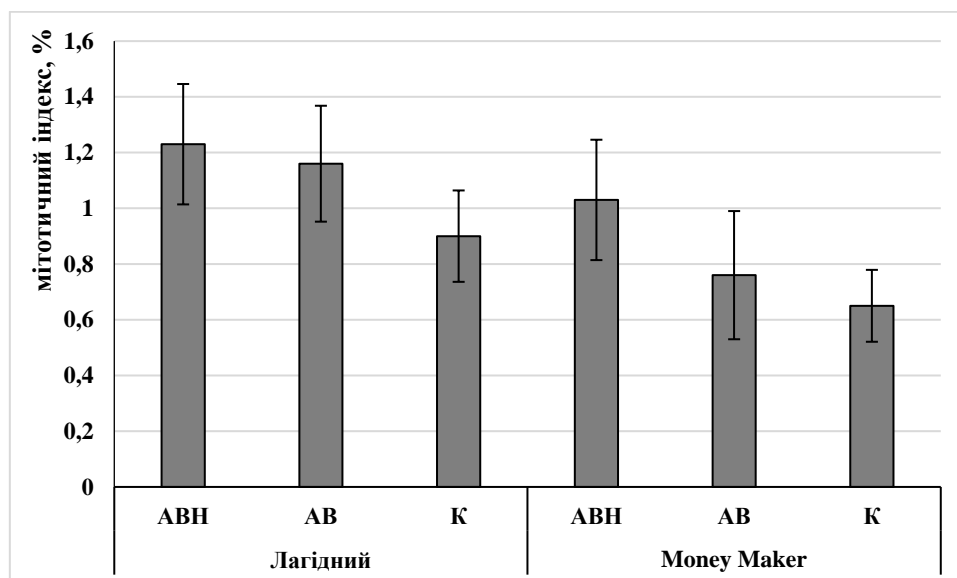


Рис. 3. Мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми рослин томатів, вирощених на середовищі МСТ у присутності препаратів Аверком (АВ), Аверком Нова (АВН) та без додавання препаратів (К).

Крім того, було виявлено деякі особливості морфології епідермальних клітин зони розтягу та корневих волосків ліній томатів, вирощених у присутності біопрепаратів, а саме: на деяких зразках коренів томатів сортів Money Maker та Лагідний спостерігали потовщення клітинної стінки (порівняно з контролем). Це може бути пов'язано із посиленням відкладання целюлози або інших складових клітинної стінки у результаті впливу біологічно активних речовин, що містяться у препаратах Аверком та Аверком Нова, отриманих на основі *Streptomyces avermitilis*, серед яких присутні, зокрема,

регулятори росту, однак це явище потребує подальшого поглибленого дослідження.

Відомо, що ґрунтові стрептоміцети є симбіотичними стимулюючими ріст бактеріями (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB), які можуть підвищувати системну стійкість рослин до різних захворювань за механізмом індукованої системної стійкості (Induced Systemic Resistance, ISR). Загалом результатом імунної відповіді рослин на сигнальні молекули патогенних мікроорганізмів (Pathogen-Associated Molecular Patterns) є активація експресії генів PR-білків (Pathogenesis Related proteins), які у випадку відповіді за типом SAR (Systemic Acquired

Resistance), опосередкованої саліциловою кислотою, надалі запускають реакції захисту від патогенів за механізмами або «ген-проти-гена», або реакції гіперчутливості (Hypersensitive Response, HR), що призводить до продукування активних форм кисню (Reactive Oxygen Species, ROS) та апоптозу [13]. У випадку реакції за типом ISR, опосередкованої жасмоновою кислотою та етиленом, захист рослин від фітопатогенів реалізується за рахунок конкуренції між PGPB та фітопатогеном за поживні речовини, та активації синтезу у рослини ферментів, що руйнують клітинну стінку грибів (хітиназ, глюканаз та ін.), депонування лігніну чи калози або синтезу вторинних метаболітів (алкалоїди, терпеноїди, феноли та ін.) [14; 15]. Крім того, відомо, що PGPB, зокрема стрептоміцети, також синтезують різні антибактеріальні сполуки (у випадку *S. avermitilis* IMV Ac-5015 – комплекс авермектинів), що інгібують ріст та розвиток фітопатогенних мікроорганізмів [2; 3; 5]. Більше того, було встановлено, що препарати на основі не тільки живих культур різних штамів стрептоміцетів, але й культуральної рідини мають ріст-стимулюючий ефект на різні рослинні культури та підвищують їх стійкість до абіотичних стресових факторів, зокрема таких, як різні хвороби, посуха, засолення ґрунтів, тощо [2–5; 14]. Завдяки вмісту ряду біологічно активних речовин (фітогормонів, ліпідів, вітамінів та амінокислот) препаратам Аверком та Аверком Нова також властивий ріст-стимулюючий та фітопротекторний вплив на рослини пшениці, огірків та тома-

тів, про що свідчать результати попередніх досліджень [2–5].

Висновки

У результаті проведених досліджень отримано лінії томатів сортів Money Maker та Лагідний, які вирощували в умовах *in vitro* у присутності поліфункціональних біопрепаратів Аверком та Аверком Нова. У клітинах кореневих апексів ліній обох сортів томатів, вирощених у присутності біопрепаратів, було помічено більш високий мітотичний індекс (0,76–1,23%), ніж у рослин контрольних ліній (0,65–0,9%), що вказує на ріст-стимулюючий вплив препаратів Аверком та Аверком Нова. Крім того, було відзначено потовщення клітинної стінки клітин коренів рослин томатів, вирощених у присутності біопрепаратів, чого не спостерігали у контрольних зразках. Отже, нами встановлено, що препарати Аверком та Аверком Нова на основі штаму *S. avermitilis* IMV Ac-5015 не лише підвищують інтенсивність поділу клітин досліджуваних рослин, але й викликають деякі зміни їх морфології (зокрема потовщення клітинної стінки), що, ймовірно, підвищить пристосування рослин до дії несприятливих факторів навколишнього середовища.

Роботу виконано за фінансової підтримки проекту «Отримання рослин зі стійкістю до фузаріозу за допомогою поліфункціональних біостимуляторів на основі авермектину» (№ 0120U103109) цільової програми наукових досліджень НАН України «Геномі, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» (2020–2024 рр.).

References

1. Santoyo G., Guzmán-Guzmán P., Parra-Cota F.I., Santos-Villalobos S.D., Orozco-Mosqueda M.D.C., Glick B.R. Plant growth stimulation by microbial consortia. *Agronomy*. 2021. Vol. 11. 219. doi: 10.3390.
2. Tsyhankova V.A., Andrushevych I.V., Biliavska L.O., Kozyrytska V.I., Iutynska H.O., Halkin A.P., Halahan T.O., Boltovska O.V. Growth stimulating, fungicidal and nematocidal properties of new microbial substances and their impact on si/miRNA synthesis in plant cells. *Microbiol. J.* 2012. Vol. 74 (6). P. 36–45. [in Ukrainian]
3. Iutynska G.O., Biliavska L.O., Kozyrytska V.Y. Development strategy for the new environmentally friendly multifunctional bioformulations based on soil streptomycetes. *Microbiol. J.* 2017. Vol. 79 (1). P. 22–33.
4. Iutynska G.O. Elaboration of natural polyfunctional preparations with antiparasitic and biostimulating properties for plant growing. *Microbiol. J.* 2012. Vol. 74 (4). P. 3–12.
5. Kolomiets Yu.V., Grygoryuk I.P., Butsenko L.M., Biliavska L.O. Systemic action of microbial preparations on the bacterial tomato pathogens. *Agroecol. J.* 2016. Vol. 3. P. 83–89. [in Ukrainian]
6. Buziashvili A., Cherednichenko L., Kropyvko S., Yemets A. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Biocat. Agricult. Biotechnol.* 2020. Vol. 25. 101602. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602>.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
8. Syakhrlil B. Aceto-orcein staining for counting somatic chromosomes in castor (*Ricinus communis* L.). *Biosci. Res.* 2019. Vol. 16 (2). P. 2336–2342.
9. Leme D.M., Marin-Morales M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res.* 2009. Vol. 682 (1). P. 71–81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002.
10. Selma T., Signem O. Comparison of cytogenetic antagonism between abscisic acid and plant growth regulators. *Pak. J. Bot.* 2012. Vol. 44 (5). P. 1581–1586.

11. Vieira C., Droste A. Biomonitoring to evaluate the toxic potential of urban solid waste landfill leachate. *Rev. Ambient. Água*. 2019. Vol. 14 (2). doi: 10.4136/ambi-agua.2326.
12. Yüzbaşıoğlu D., Unal F., Sancak C. Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L. *Turk. J. Biol.* 2009. Vol. 33. P. 283–290. doi: 10.3906/biy-0807-23.
13. Romera F.J., García M.J., Lucena C., Martínez-Medina A., Aparicio M.A., Ramos J., Alcántara E., Angulo M., Pérez-Vicente R. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe deficiency responses in Dicot plants. *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10. 287. doi: 10.3389/fpls.2019.00287.
14. Sousa J.A.J., Olivares F.L. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016. Vol. 3. 24. doi: 10.1186/s40538-016-0073-5.
15. Pacios-Michelena S., Aguilar González C.N., Alvarez-Perez O.B., Rodriguez-Herrera R., Chávez-González M., Arredondo Valdés R., Ascacio Valdés J.A., Govea Salas M., Ilyina A. Application of streptomycetes antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. *Front. Sustain. Food Syst.* 2021. Vol. 5. 696518. doi: 10.3389/fsufs.2021.696518.

BUZIASHVILI A.Yu.¹, BRYLENKO H.S.², YEMETS A.I.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2A

² Educational and Scientific Center “Institute of Biology and Medicine” of the Kyiv National University of Taras Shevchenko, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2A

GROWTH STIMULATING ACTIVITY OF AVERMECTIN-CONTAINING PREPARATIONS ON TOMATO LINES *IN VITRO*

Aim. Obtaining of the tomato lines of cvs. Money Maker and Lahidny in the presence of polyfunctional preparations Avercom and Avercom Nova and cytological analysis of their influence on tomato root cells. **Methods.** Cotyledons of 10–11-day-old tomato seedlings were cultivated on MST medium for 1–3 months in the presence of 1 mg/l zeatin, 1 mg/l indole-acetic acid and 25 µl/l of Avercom or Avercom Nova. Then, regenerated lines were grown on MST medium supplemented with biopreparations for 1 month. The roots of tomato plants were fixed in the solution of ethanol and glacial acetic acid (3:1), stained in 1 % aceto-orseine solution and investigated at x600 magnification. **Results.** In this work, the tomato lines were obtained and grown in the presence of biopreparations Avercom or Avercom Nova. It was shown that mitotic index (MI) in the root meristematic cells of the plants grown in the presence of biopreparations was at 0.76–1.23 %, and it was higher than in the control plants (0.65–0.9 %). Moreover, the thickened cell walls of root cells of plants grown in the presence of biopreparations was detected compared to control plants. **Conclusions.** Tomato plants grown in the presence of biopreparations Avercom or Avercom Nova are characterized not only by the increased MI of meristematic cells but also by the thickened cell walls of root cells which indicate the growth stimulating effects of biopreparations and their capacity to enhance the resistance of plants to stressful factors.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, *Streptomyces avermitilis*, avermectin-containing polyfunctional preparation, Avercom, Avercom Nova.