

УДК 582.282.23:576.858.8

**О.І. Балко, О.А. Кіпріанова, О.Г. Коваленко, В.В. Шепелевич,
Л.В. Авдєєва**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ ГСП, ДО 3680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: aleks-balko@yandex.ru

АНТИФІТОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ БІОПРЕПАРАТУ ГАУПСИН

*Інсектофунгіцидний біопрепарат гаупсин гальмує на 73–100% інфекційність вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на рослинах дурману (*Datura stramonium*) та тютюну (*Nicotiana tabacum*). Високу антивірусну активність виявили як самі штами *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 – діючі агенти препарату, так і термостабільні водорозчинні фракції, отримані з їх культуральної рідини шляхом осадження етанолом. Останні гальмували на 86–96% розвиток інфекції, викликаной ВТМ, проте не були здатні підсилювати рослинний імунітет.*

*Ключові слова: інсектофунгіцидний препарат гаупсин, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, вірус тютюнової мозаїки, антифитовірусна активність.*

Вірусні хвороби рослин відзначаються широким розповсюдженням в агро- та біоценозах та високою шкодочинністю і тому викликають значні економічні збитки в рослинництві [2]. Відомі хімічні речовини, здатні пригнічувати розмноження вірусів, як правило, інгібують і нормальні метаболічні процеси в рослинах [8] і відзначаються значною фітотоксичністю, до того ж ускладнюють проблеми екологічної рівноваги в довкіллі.

Отже, проблема терапії і профілактики рослин від вірусних інфекцій все ще залишається не розв'язаною. Одним із підходів до вирішення цієї проблеми є створення комплексних антивірусних препаратів на основі природних сполук, нешкідливих для людей і теплокровних тварин [9]. Перспективним джерелом подібних біопрепаратів є сапрофітні бактерії роду *Pseudomonas*, зокрема представники виду *P. aureofaciens* (згідно сучасній термінології *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*), що належать до найбільш активних продуцентів антибіотиків серед бактерій роду *Pseudomonas* [7]. Поряд з відомими чинниками (наприклад, антибіотиками феназинового ряду), штами цього виду є продуцентами широкого спектру біологічно активних речовин, ще не досліджених з точки зору їхньої захисної дії проти збудників захворювань рослин.

Біопрепарат гаупсин, створений на основі двох штамів *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* і захищений патентом України [11], має поряд з антифунгальною



і антибактеріальною значну ентомопатогенну активність, що забезпечує його широке використання проти шкідників і збудників захворювань рослин. В той же час його вплив на збудників вірусних захворювань рослин досі не був досліджений.

Метою нашої роботи була оцінка протівірусних властивостей препарату гаупсину, штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306, що входять до його складу, та продуктів їх метаболізму на моделі вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) .

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був біопрепарат гаупсин та його діючі агенти — штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306.

Як тест-об'єкт використовували ВТМ (штам U₁). Суспензію вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) в концентрації 2 мг/мл, очищеного методом диференціального центрифугування [3], зберігали при 4 °С в ампулах у 0,01 М фосфатному буфері рН 7,4 та використовували за необхідності.

З метою отримання інсектофунгіцидного біопрепарату гаупсин штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 вирощували на промисловому органі-мінеральному середовищі з мелясою і кукурудзяним екстрактом [11]. Для дослідження антивірусного ефекту використовували не тільки гаупсин, але й метаболіти, отримані з його окремих штамів, вирощених на напівсинтетичному середовищі Кінг А та синтетичному середовищі Козера [7]. Для отримання культуральної рідини із підвищеним вмістом екзополісахаридів типу леванів в поживне середовище вносили 0,1% сахарози, для одержання альгінатів — таку ж кількість глюкози. Культивування бактерій проводили на качалці при 200 об/хв і 28 °С протягом трьох діб.

Метаболіти вилучали з культуральної рідини, звільненої від бактеріальних клітин шляхом центрифугування при 12000 об/хв протягом 20 хв. Супернатант змішували із подвійним об'ємом етанолу і центрифугували при 5000 об/хв протягом 8 хв. Осад розчиняли в дистильованій воді, після чого ліофілізували. Для випробування антивірусної активності одержані препарати розчиняли у стерильній дистильованій воді .

Здатність препарату гаупсин, штамів, що входять до його складу та отриманих позаклітинних речовин гальмувати розвиток вірусної інфекції вивчали на надчутливих до ВТМ рослинах дурману (*Datura stramonium* L.) та тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Імунний 580, як описано раніше [3]. При цьому використовували два підходи: а) додавання досліджуваних речовин до інокулюму за 30 хв до інокуляції рослин (у контролі до вірусу додавали воду); б) обприскування рослин гаупсином у 3-х розведеннях (нерозведений та розведений 1:10 та 1:100 водою) за одну добу до інокуляції ВТМ. Через 7 діб після інокуляції рослин ВТМ підраховували кількість локальних некротів у досліді та контролі.

Здатність гаупсину індукувати стійкість рослин до ВТМ досліджували на тютюні сорту Імунний 580, як описано в літературі [9]. Водні розчини препарату (1,0 та 2,5 мг/мл) вводили субепідермально в ліві половинки листків, протилежні, праві половинки обробляли в такий же спосіб водою. Через 3 доби обидві половинки листків інокулювали ВТМ (4 мкг/мл), а через 7 діб підраховували кількість некротичних уражень.



Ступінь пригнічення вірусної інфекції (I) розраховували за формулою:

$$I = (1 - D/K) \cdot 100, \%$$

де K — середня кількість некрозів у контролі, D — те ж у досліді.

Отримані результати обробляли статистично з використанням методу парних порівнянь [6].

Результати та їх обговорення

Препарат гаупсин, одержаний сумісним культивуванням штамів УКМ В-111 і УКМ В-306 на органо-мінеральному промисловому середовищі, мав титр $2 \cdot 10^{10}$ КУО в 1 мл і представляв собою суміш клітин псевдомонад, продуктів їх активного синтезу та залишків живильного середовища.

Нерозведений препарат, доданий до інокулюму ВТМ та нанесений на опушене карборундом листя надчутливих рослин дурману та тютюну, гальмував розвиток вірус-індукованих уражень (некрозів) на 80–97% (табл. 1).

Таблиця 1

Активність гаупсину щодо інфекційності ВТМ на двох рослинах-індикаторах, надчутливих до цього вірусу

Table 1

Gaupsin activity against TMV infectivity in two indicative plants hypersensitive to this virus

Рослина-індикатор	Кількість некрозів / лист		Пригнічення, %
	дослід	контроль	
<i>Datura stramonium</i>	35,1	172,7	79,7
<i>Nicotiana tabacum</i> *	0,4	12,3	96,7

* Сорт Імунний 580, надчутливий до ВТМ

Подальше розведення його у 10 та 100 разів водою призводило відповідно до часткового та повного зникнення антивірусної активності (табл. 2).

Таблиця 2

Антивірусна активність різних розведень гаупсину на рослинах дурману, уражених ВТМ

Table 2

Antiviral activity of different gaupsin dilutions in stramonium plants affected with TMV

Розведення гаупсину	Загальна кількість некрозів		Середня кількість некрозів на одній половинці листка		Пригнічення, %
	дослід	контроль	дослід	контроль	
нерозведений	21	300	1,5	21,4	93,0
1:10	140	272	12,7	24,7	48,6
1:100	387	253	38,7	25,3	-46,8*

* стимуляція утворення некрозів, індукованих ВТМ



Застосування гаупсину іншим способом, а саме запобіжним обприскуванням рослин (до штучного зараження) показало більш високу його ефективність (табл. 3). Нерозведений препарат захищав рослини від ураження ВТМ повністю, а розведений у 10 та 100 разів — відповідно на 80 та 44%.

Таблиця 3
Пригнічення розвитку локальної інфекції ВТМ, виявлене при триразовому обприскуванні рослин дурману гаупсином

Table 3
Inhibition of local TMV infection development revealed at three times repeated stramonium spraying by gaupsin

Розведення гаупсину	Загальна кількість некрозів/кількість листків		Середня кількість некрозів на одній половині листка		Пригнічення, %
	дослід	контроль	дослід	контроль	
нерозведений	0	463/27	0	17,1	100
1:10	74/23		3,2		81,3
1:100	303/32		9,5		44,4

Подальші дослідження показали, що окремі штами — компоненти гаупсину, вирощені на промисловому середовищі, теж мали значну активність щодо ВТМ: 96% захисту для штаму В-306 і 94% — для штаму В-111.

Нами було встановлено, що антивірусна дія гаупсину пов'язана з синтезом екзометаболітів, які в процесі ферментації виділяються штамми *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* в культуральне середовище. На основі припущення, що це можуть бути полісахариди або інші біополімери, ми використали для їх одержання загальноприйнятій метод осадження з культурального середовища етанолом. Одержані таким чином з гаупсину термостабільні водорозчинні метаболіти в концентрації 10 мг/мл мали активність щодо ВТМ 84%.

Раніше нами було показано, що феназинові пігменти, що утворюються штамми *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, не мають істотних антивірусних властивостей [7]. В той же час відомо, що представники цього виду є активними продуцентами екзополісахаридів: нейтрального левану та кислих альгінатів. Додаючи в синтетичне середовище сахарозу або глюкозу як єдине джерело вуглецю, ми намагалися створити умови для вибіркового утворення полісахаридів різних класів — леванів або альгінатів [10]. Останні досліджували на наявність антивірусної активності щодо ВТМ. Виявилось, що обробка листків тютюну препаратами, отриманими на середовищі Козера із сахарозою або глюкозою, практично не впливала на розвиток вірусної інфекції.

Співвідношення кількості некрозів, викликаних ВТМ на дослідних та контрольних половинках листків тютюну, коливалось у межах 0,7–1,0. В свою чергу, обробка листя тютюну метаболітами, які утворювались при вирощуванні бактерій на напівсинтетичному середовищі Кінг А, супроводжувалась пригніченням розвитку ВТМ-інфекції на 96,3%. Одержані в цих умовах метаболіти були активнішими навіть за ті, що синтезувались на орґано-



мінеральному промислового середовищі (табл. 4), а їх антивірусний ефект залежав від концентрації (табл. 5).

Таблиця 4
Антивірусна активність метаболітів штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 та УКМ В-306 при сумісному культивуванні на промислового і напівсинтетичному середовищі Кінг А

Table 4
Antiviral activity of strains *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* UCM В-111 and UCM В-306 metabolites at co-cultivation in industrial and semisynthetic medium King A

Середовище	Середня кількість некрозів, індукованих ВТМ на дурмані штук / лист		Пригнічення, %
	дослід	контроль	
Органо-мінеральне промислове	5,9	36,3	83,7
Кінг А	0,4	4,8	91,7

Таблиця 5
Пригнічення інфекції ВТМ на дурмані метаболітами штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* на середовищі Кінг А

Table 5
Inhibition of TMV infection in stramonium by *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* strains metabolites in medium King A

Штам	Концентрація, мг/мл	Кількість некрозів/кількість половинок листків		Середня кількість некрозів на одній половині листа		Пригнічення, %
		дослід	контроль	дослід	контроль	
УКМ В-111	0,1	296/9	321/9	32,9	35,7	8,4
	1,0	138/10	281/10	13,8	28,1	50,9
	10	18/13	304/13	1,4	23,4	94,0
УКМ В-306	0,1	283/11	311/11	25,7	28,3	9,2
	1,0	142/9	279/9	15,8	31,0	49,0
	10	25/14	296/14	1,9	21,1	91,0

Відомо, що полісахариди, продуковані деякими мікроорганізмами, здатні підсилювати захисні механізми рослин. Подібний вплив було обґрунтовано експериментально для аніонних і катіонних глікополімерів [4, 5, 6].

Можливість втручання у вірусіндуковані захисні реакції рослин доведено і для нейтральних полісахаридів. Тому наступним етапом роботи була перевірка здатності препаратів метаболітів, одержаних нами із культуральної рідини

P. chlororaphis subsp. aureofaciens УКМ В-111 та УКМ В-306, індукувати стійкість рослин тютюну до інфекції ВТМ (табл. 6).

Таблиця 6
Вплив метаболітів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111, на стійкість тютюну до ВТМ-інфекції

Table 6
Effect of *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* UCM В-111 strain metabolites on tobacco resistance to TMV-infection

Середовище	Концентрація препарату, мг/мл	Середня кількість некрозів на 1 лист		Відношення дослід до контролю
		дослід	контроль	
Козера з глюкозою	1,0	5,9	7,0	0,84
	2,5	6,9	7,7	0,90
Козера з сахарозою	1,0	55,7	38,3	1,45
	2,5	73,7	78,4	0,94
Кінг А	1,0	36,2	23,8	1,52
	2,5	68,8	47,6	1,44

Встановлено, що незалежно від штаму та середовища культивування, досліджені препарати метаболітів не знижували кількість утворюваних ВТМ некрозів, а в деяких випадках спостерігалось навіть збільшення їх кількості.

Таким чином, метаболіти, одержані з штамів-продуцентів гаупсину, гальмували розвиток інфекції, викликані ВТМ, проте не були здатні підсилювати рослинний імунітет. Склад середовища культивування визначав природу утворюваних речовин і, відповідно, їх антивірусні властивості. Найбільш високий рівень пригнічення ВТМ мали метаболіти, утворювані штамми *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* при культивуванні на середовищі Кінг А, основним джерелом вуглецю і енергії в якому є гліцерин. Хімічна природа утворюваних в цих умовах антивірусних агентів потребує подальших досліджень.

Наведені вище дані свідчать про наявність у штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* і створеного на їх основі біопрепарата гаупсин антифітовірусного ефекту. Зазначимо, що біологічні засоби захисту рослин, які посідають все більш значне місце на ринку продуктів біотехнології, є, як правило, моновалентними і спрямованими тільки проти одного чи однієї групи шкідників або патогенів рослин. В той же час досить привабливим є створення на основі мікроорганізмів комплексних біопрепаратів, які мають кілька видів біологічної активності.

В попередні роки нами було встановлено що поряд з антибактеріальною, антифунгальною, ентомоцидною (а за деякими даними — і нематоцидною) активністю, штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* гальмують пухлиноутворення, спричинене збудником бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens* [1]. Наведені в цій роботі дані свідчать, що вони є також інгібіторами фітовірусних інфекцій. Цікаво, що цей унікально широкий спектр корисних властивостей,



характерних для представників названого виду, сформований самою природою і є результатом еволюції, а не генетичних маніпуляцій, широко використовуваних в сучасній біотехнології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балко О.І., Авдєєва Л.В. Вплив екзополісахаридів *Pseudomonas aureofaciens* на пухлиноутворення спричинене *Agrobacterium tumefaciens* // Мікробіол. журн. — 2009. — 71, № 3. — С. 15–19.
2. Власов Ю.И. Вирусные и микоплазменные болезни растений. — М.: Колос, 1992. — 208 с.
3. Коваленко А.Г., Щербатенко И.С., Олещенко Л.Т. Инфицирование протопластов мезофилла картофеля вирусом табачной мозаики // Биол. науки. — 1985. — № 2. — С. 42–47.
4. Коваленко О.Г., Телегеева Т.А., Штакун А.М., Погоріла З.О. Вплив деяких моно- і полісахаридів на локалізацію вірусної інфекції та індуквану вірусостійкість у рослин // Біополімери і клітина. — 2000. — 16, № 1. — С. 53–59.
5. Коваленко О.Г., Кириченко А.М., Шепелевич В.В., Баркалова А.О. Комбінована антифитовірусна дія дріжджового манану, деяких антиметаболітів і ксенобіотиків // Допов. НАН України. — 2006. — № 3. — С. 153–157.
6. Молостов А.С. Элементы вариационной статистики. — Киев: Урожай, 1965. — 180 с.
7. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. — 263 с.
8. Hansen A.F. Antiviral chemicals for plant disease control // Critical Reviews in Plant Sciences. — 1989. — № 8. — P. 45–88.
9. Kovalenko O.G., Polishchuk O.M., Wasser S.P. Virus resistance induced by glucuronoxylomannan isolated from submerged cultivated yeast-like cell biomass of medicinal yellow brain mushroom *Tremella mesenterica* Ritz.:Fr. (*Heterobasidiomycetes*) in the hypersensitive host plants // Int. J. Med. Mushrooms. — 2009. — 11, № 2. — P. 199–205.
10. Osman S.F., Fett W.F., Fishman M.L. Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* // J. Bacteriol. — 1986. — 166, № 1. — P. 66–71.
11. Пат. 73682 UA, АО 1N 63/00, С 12 N 1/20. Инсектофунгицидный препарат гаупсин для борьбы із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О.А. Кіпріанова, С.В. Гораль. — Заявл. 10.03.2004; Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.

**О.И. Балко, Е.А. Киприанова, А.Г. Коваленко, В.В. Шепелевич,
Л.В. Авдеева**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного
НАН Украины, ул. Акад. Заболотного, 154, Киев ГСП, ДО 3680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: aleks-balko@yandex.ru

АНТИФИТОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ БИОПРЕПАРАТА ГАУПСИН

Реферат

Инсектофунгицидный биопрепарат гаупсин тормозил на 73–100% инфекционность вируса табачной мозаики (ВТМ) на растениях дурмана (*Datura stramonium*) и табака (*Nicotiana tabacum*).

Высокую активность как продуценты антифитовирусных веществ обнаружили и отдельные штаммы *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 — действующие агенты препарата, а также термостабильные водорастворимые фракции, полученные из их культуральных жидкостей путем осаждения двумя объемами этанола. Последние тормозили на 86–96% развитие инфекции, вызванной ВТМ, однако не были способны усиливать иммунитет растений.

Ключевые слова: инсектофунгицидный препарат гаупсин, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, вирус табачной мозаики, антифитовирусная активность.

**O.I. Balko, E.A. Kiprianova, A.G. Kovalenko, V.V. Shepelevych,
L.V. Avdeeva**

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv GSP DO 3680, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: aleks-balko@yandex.ru

ANTIPHYSOVIRAL ACTIVITY OF GAUPSIN BIOPREPARATION

Summary

Insectofungicidal biopreparation gaupsin inhibited for 73–100% the tobacco mosaic virus (TMV) infectivity in thornapple (*Datura stramonium*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants.

The high activity of antiphytoviral substances production has been also shown by separate strains of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* UCM B-111 and UCM B-306 — the active agents of gaupsin preparation — as well as by the thermostable water-soluble fractions isolated from their cultural fluids using sedimentation by two ethyl alcohol volumes. The latter inhibited for 86–96% infection development caused by TMV but they could not improve the plant immunity.

Key words: insectofungicidal biopreparation gaupsin, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, tobacco mosaic virus, antiphytoviral activity.

