



УДК 581.192.7:582.746.56:582.632.2:595.782

ПІДВИЩЕННЯ ІМУНОЗАХИСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВИДІВ РОСЛИН РОДУ *Aesculus L.* ДО КАШТАНОВОЇ МІНУЮЧОЇ МОЛІ (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic) ЗА ДОПОМОГОЮ БІОСТИМУЛЯНТА "РЕГОПЛАНТ"

В.А. ЦИГАНКОВА*, кандидат біологічних наук
Т.Л. ДЕМЧУК**, молодший науковий співробітник
І.П. ГРИГОРЮК**, член-кореспондент НАН України
А.І. ЄМЕЦЬ***, доктор біологічних наук
С.П. ПОНОМАРЕНКО****, кандидат хімічних наук
А.П. ГАЛКІН***, доктор біологічних наук
Я.Б. БЛЮМ***, академік НАН України

* Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

** Національний університет біоресурсів і природокористування України

*** Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України

**** Міжвідомчий науково-технологічний центр "АГРОБІОТЕХ" НАН України та Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України

За допомогою методу молекулярної (Dot-блот) гібридизації si/miРНК у листках різних за стійкістю видів рослин роду *Aesculus L.* до каштанової мінуючої молі (КММ) уперше встановлено більш ніж 50 % гомології в спектрах (наборах) si/miРНК-основних складових регуляції генетичних процесів на посттранскрипційному–трансляційному рівнях. Визначено, що внутрішньовидові відміни в гібридизації si/miРНК з мРНК у листках рослин становлять 8–13 %, міжродові – 18–22 %. У листках стійких до КММ рослин ступінь гомології в популяціях si/mi РНК знижується, порівняно з нестійкими, на 30–34 %. Використання біостимулянта "Регоплант" індукує підвищення стійкості рослин до КММ шляхом стимуляції синтезу специфічних імуноскладових si/miРНК. Рівень синтезу протипатогенних чи протипаразитарних si/miРНК у клітинах рекомендовано використовувати як генетичний маркер для визначення стійкості рослин до КММ.

Вступ. Реконструкція природного середовища в Україні розглядається як важлива соціально-економічна проблема. Особливої актуальності набуває вирішення проблем, пов'язаних із використанням, збереженням та відновленням каштанових насаджень у міських мегаполісах, оскільки рослини каштанів є уні-

кальними індикаторами екологічних умов і стану забруднення довкілля, виконують важливу екосферну функцію, виступають універсальними природними фільтрами очищення ґрунту, повітря й води від техногенних забруднень, мають важливе архітектурне, лікувальне та народногосподарське значення [2,3].



Глобальні зміни клімату, несприятливі екологічні й супутні стресові чинники індукують масове розмноження шкідників, що з'являються в нових регіонах, наприклад, каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic), яка уражує листки рослин гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.). Даний шкідник відноситься до ряду Лускокрилих (*Lepidoptera*), родини молей-строкаток (*Glacillariidae*); для нього характерним є 3–5 генерацій за сезон, наявність достатньої кількості кормових ресурсів, відсутність природних ворогів та висока швидкість розселення ареалу, що спричинює інфекційне усихання листків і передчасну загибель рослин гіркокаштана звичайного в природних умовах середовища [6]. В результаті ураження КММ багатьох видів рослин роду *Aesculus* L. відбувається повторне утворення невеликих за розмірами молодих листків зі сплячих бруньок і цвітіння окремих рослин у середині літа або на початку осені, що супроводжується зниженням інтенсивності й спрямованості метаболічних процесів, декоративних якостей та врожаю плодів [2,3]. Багаторічне пошкодження КММ призводить до послаблення імунітету й зниження стійкості рослин гіркокаштана до патогенних організмів.

Нами уперше розроблено способи оцінки видів рослин роду *Aesculus* L. до КММ за інтегральними біохімічними показниками [4]. Водночас виявлено, що зв'язана з клітинними стінками пероксидаза є специфічним маркером стійкості рослин до КММ [5]. Встановлено також, що визначальна роль у захисті еукаріотичних організмів (рослин, теплокровних тварин, грибів) від хвороб належить антисенсовим низькомолекулярним регуляторним si/miРНК, які шляхом сайленціювання (блокування трансляції) мРНК патогенів і паразитів (а також участі в подальшому руйнуванні блокова-

них мРНК специфічними нуклеазами) забезпечують оптимальне функціонування імунних систем організму [7–10].

З огляду на це, важливо з'ясувати відмінності за "спектрами" (чи наборами) популяції si/miРНК у різних за рівнем стійкості видів рослин роду *Aesculus* L. до КММ, а також як генетичних маркерів для розробки методологічних підходів щодо надання індукованої стійкості нестійким рослинам шляхом активації експресії генів чи введенням додаткових генів синтезу специфічних si/miРНК або біологічно активними сполуками чи введенням додаткової кількості генів синтезу специфічних si/miРНК методами генетичної інженерії.

Мета роботи – провести молекулярно-генетичний аналіз ступеня гомології (подібностей чи відмінностей) популяції малих регуляторних si/mi РНК у листках видів рослин роду *Aesculus* L. з різною стійкістю до КММ, а також каштана їстівного роду *Castanea* Mill. (не ушкоджується КММ) по відношенню до мРНК одного із найстійкіших до КММ гіркокаштана восьмитичинкового або жовтого (контроль).

Об'єкти і методи досліджень. Об'єктами досліджень слугували види рослин роду *Aesculus* L. віком 15–20 років, а саме: гіркокаштан гібридний жовто-рожевий (*Aesculus hybrida* D.C.); гіркокаштан м'ясочервоний або яскраво-червоний (*Aesculus carnea* Hayne.); гіркокаштан червоний або павія (*Aesculus pavía* L.); гіркокаштан дрібноквітковий (*Aesculus purviflora* Walt.); гіркокаштан восьмитичинковий або жовтий (*Aesculus octandra* Marsh.); гіркокаштан гладколистий або голий (*Aesculus glabra* Willd.); гіркокаштан забутий (*Aesculus neglecta* Lindl.); гіркокаштан звичайний (*Aesculus hippocastanum* L.); гіркокаштан звичайний, форма Баумані (*Aesculus hippocastanum*, f. *Baumanii* C.K. Schneid.); гіркокаштан лісовий або дикий (*Aes-*



culus silvatica Bartz.); каштан їстівний (*Castanea sativa* Mill.). Вказані види інтродуковано в Ботанічному саду НУБіП України та поодинокі зростають у природних умовах Голосіївського лісу Києва.

Для дослідів використовували новий композиційний біостимулянт "Регоплант", який містить у своєму складі регулятор росту "Радостим" та аверсектини (продукти життєдіяльності бактерій *Streptomyces avermectilis*) з рістрегуляторною і біозахисною дією (ТУ У 24.2 – 31168762–006), яка ґрунтується на активації синтезу в рослинних сайсленсових si/miРНК, комплементарних мРНК шкідника, що сприяє загибелі патогена на клітинному рівні. За даних умов у три-п'ять разів збільшується ефективність інсектицидної, нематоцидної і акарицидної дії аверсектинів унаслідок синергічної дії полікомпонентів препарату [1]. Контролем слугували листки рослин, не оброблені біостимулянтном.

Екзогенну обробку листової поверхні видів рослин роду *Aesculus* L. проводили водним розчином Регопланту (10 мл на 10 л води), розрахованого нами дослідним шляхом, за температури 20–22°C і відносної вологості повітря 55–60 % ранцевим обприскувачем "ОРР-1А ЕРА" в суху та сонячну погоду. Для експериментів брали наважки по 3 г непошкоджених листків у фазу початку викидання волоті (18.04.2012 р.) і фіксували рідким азотом у чотирикратній повторності. Дослідження виконували безпосередньо в клітинах листків, що дає можливість попередження деструкції нуклеїнових кислот. Виділення з листків рослин мРНК і si/miРНК та їх молекулярну гібридизацію здійснювали за методикою [8, 9]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням пакету програм Statistica 6.0.

Результати досліджень. Листки видів рослин роду *Aesculus* L. відзначаються

різним ступенем стійкості до КММ (табл.), яка може виступати як індикатор кліматичних змін й екологічного стану навколишнього природного середовища. Так, відміни в наборах (популяціях) малих регуляторних si/miРНК (відповідно і мРНК), які контролюють процеси трансляції мРНК (сайсленсіювання мРНК), у листках видів рослин роду *Aesculus* L., стійких до КММ, коливаються в межах від 8 до 13 %, а у нестійких – від 18 до 22 % залежно від генетичних особливостей. Зокрема, набір si/miРНК у листках каштана їстівного роду *Castanea* Mill., який не ушкоджується КММ, за показниками молекулярної гібридизації з мРНК (через кДНК), порівняно з рослинами роду *Aesculus* L., пов'язаний, значною мірою, із родовими відмінностями в нуклеотидних послідовностях транскриптів мРНК у даних генотипах. Отримані результати свідчать про наявність більш ніж 50 % гомології в si/miРНК у листках рослин видів і родів каштанів за показниками молекулярної (Dot-блот) гібридизації si/miРНК з мРНК (через кДНК), що підтверджує суттєві внутрішньовидові та міжродові зв'язки.

У проведених дослідженнях чутливість стійких до КММ видів рослин роду *Aesculus* L. до біостимулянта "Регоплант" за зміною популяційних показників мРНК і, відповідно, захисних si/miРНК, практично не відрізнялась від таких у листках рослин, що не піддавались екзогенній обробці препаратом. Навпаки, у листках видів рослин гіркокаштана, які значною мірою уражуються КММ, під впливом біостимулянта гібридизаційні показники достовірно наближались до визначених у неуражених КММ рослин.

Таким чином, антипаразитарна дія біостимулянта "Регоплант" відбувається на рівні функціонування молекулярно-генетичних процесів у клітинах видів рослин роду *Aesculus* L. (підсилення захисних ре-

Таблиця. Молекулярно-генетичний аналіз рівня (відсотків) гомології (або різниць в гомології) популяції регуляторних сі/міРНК в листках видів рослин роду *Aesculus* L. і каштана їстівного роду *Castanea* Mill. відносно до мРНК найстійкіших до каштанової мінулої молі виду рослин гіркокаштан восьмитичинкового або жовтого

Вид	Ступінь гомології, %				Ступінь стійкості рослин до КММ
	I*	II*	III*	IV*	
Рід <i>Aesculus</i> L.					
1. Гіркокаштан восьмитичинковий або жовтий – контроль (гібридизація власних сі/міРНК з мРНК через к/ДНК) (контроль)	1:98±1,2				
2. Гіркокаштан гібридний жовто-рожевий	88±1,6 (-10%)	86±1,1 (-10-12%)	-	-	
3. Гіркокаштан гладколистий або голий	85±1,8 (-13%)	83±1,4 (-14%)	-	-	
4. Гіркокаштан м'ясочервоний або яскраво-червоний	87±1,3 (-11%)	85±1,2 (-12%)	-	-	Стойкі
5. Гіркокаштан дрібноквітковий	89±1,6 (-9%)	87±1,4 (-11%)	-	-	
6. Гіркокаштан забутий	86±1,4 (-12%)	84±1,3 (-12%)	-	-	
7. Гіркокаштан червоний або павія	90±1,1 (-8%)	88±1,2 (-10%)	-	-	
8. Гіркокаштан звичайний	84±1,6 (-14%)	87±1,5 (-16%)	64±1,3 (-34%)	78±1,6 (-20%)	
9. Гіркокаштан звичайний, форма Баумані	78±1,7 (-20%)	76±1,4 (-22%)	58±1,4 (-30%)	74±1,7 (-24%)	Нестійкі
10. Гіркокаштан лісовий або дикий	82±1,3 (-16%)	80±1,2 (-18%)	68±1,4 (-30%)	76±1,4 (-22%)	
Рід <i>Castanea</i> Mill.					
11. Каштан їстівний	64±1,2 (-34%)	60±1,5 (-38%)	-	-	Не ушкоджується

Примітки: I* - видові (1-10) і родові (1-10 й 11) різниці в популяційних характеристиках мРНК та сі/міРНК; II* – вплив біостимулянта "Ретоплант" на популяційні характеристики мРНК і сі/міРНК; III* – сі/міРНК в популяційних характеристиках мРНК та сі/міРНК у листках нестійких до КММ видів рослин роду *Aesculus* L.; IV* – ступінь відновлення рівня гібридизаційних показників у листках нестійких до КММ видів рослин роду *Aesculus* L. відносно тих же видів рослин за допомогою біостимулянта «Ретоплант».



акцій і надання генетичної стійкості нестійким до КММ видам рослин). Найвні інтегральні показники рівня гомології можуть бути використані як генетичні маркери для визначення ступеня стійкості видів рослин роду *Aesculus* L. і можливості її надання нестійким до КММ рослинам за допомогою біостимулянта "Регоплант" та методів генетичної інженерії.

Висновки

Виявлено достовірні відміни в популяціях (наборах) регуляторних si/miРНК (відповідно і мРНК), що контролюють процеси трансляції мРНК (сайсленсіювання мРНК), які, в листках стійких до КММ видів рослин роду *Aesculus* L., коливаються в межах 8–13 %, а в нестійких – 18–22 %. Набір si/miРНК у листках виду рослин каштана їстівного, який не уражується КММ, за показниками молекулярної гібридизації з мРНК (через кДНК) відрізняється на 34 %, що пов'язано, очевидно, з міжродовими відмінами нуклеотидних послідовностей транскриптів

мРНК. Встановлено більш ніж 50 % гомології si/miРНК у листках видів рослин за показниками молекулярної (Dot-блот) гібридизації si/miРНК з мРНК (через кДНК), що підтверджує наявність міжвидових генетичних зв'язків.

Чутливість стійких видів рослин до біостимулянта "Регоплант", за зміною популяційних показників мРНК і захисних si/miРНК, практично не відрізняється від аналогічних у контрольних рослин. У нестійких же видів під впливом цього препарату гібридизаційні показники наближаються до рівня стійких. Підтверджено антипаразитарну і антипатогенну дію біостимулянта "Регоплант" у клітинах рослин гіркокаштана на рівні молекулярно-генетичних процесів (надає генетичну стійкість нестійким до КММ рослинам).

Показники гомології регуляторних si/miРНК рекомендується використовувати як генетичні маркери для визначення ступеня стійкості рослин до КММ.

Література

1. Анішин Л.А., Пономаренко С.П., Грицаєнко З.М. Регулятори росту рослин: Рекомендації по застосуванню. – К.: ДП МН ТЦ "Агробіотех". – 2011. – 40 с.
2. Біологія каштанів / Григорюк І.П., Машковська С.П., Яворовський П.П., Колесніченко О.В. – К.: Логос, 2004. – 380 с.
3. Каштан – історичний символ Києва / Григорюк І.П., Мельничук М.Д., Машковська С.П. – К.: Поліграф Консалтинг, 2006. – 212 с.
4. ДНК-маркери і способи оцінки видів і гібридів рослин роду Гіркокаштан (*Aesculus* L.) до каштанової мінулої молі (*Camergaria ochridella* Deschka et Dimic) в екологічних умовах Київського мегаполісу: Метод. рекомендації / Григорюк І. П., Демчук Т.Л., Серга О.І. та ін. – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 29 с.
5. Демчук Т.Л., Григорюк І.П., Ліханов А.Ф., Мельничук М.Д., Ключащенко А.А. Система конституціональної стійкості рослин роду *Aesculus* L. до каштанової мінулої молі (*Camergaria ochridella* Deschka et Dimic) // Доп. НАН України, 2012 – №7. – С. 144–152.
6. Каштановая минирующая моль в Украине / Зерова М.Д., Никитенко Г.Н., Нарольський Н.Б. - К.: ТОВ "Верец", 2007. - 87 с.
7. Циганкова В.А., Галкін А.П., Галкіна Л.О., Саблук В.Т., Калатур К.А., Стефановська Т.Р., Пономаренко С.П. Збільшення синтезу малих регуляторних РНК з імуномодулюючими властивостями в клітинах рослин під впливом регуляторів росту // Цукрові буряки. – 2011. – 82, № 4. – С. 10–12.
8. Циганкова В.А., Андрусевич Я.В., Блюм Я.Б. Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/miRNA з антинематодною активністю // Доп. НАН України. – 2011. – № 9. – С. 159–164.



9. Циганкова В.А., Стефановська Т.Р., Андрусевич Я. В., Пономаренко С.П., Галкін А. П., Блюм Я. Б. Індукція регуляторами росту біосинтезу si/miRNA з антипатогенними та антипаразитарними властивостями в клітинах рослин // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 3. – С. 62–74.
10. Циганкова В. А., Пономаренко С.П., Блюм Я. Б. Молекулярно-генетичні механізми дії регуляторів росту рослин з біозахисними властивостями // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – 10, № 1. – С. 86–94.

АННОТАЦІЯ

Циганкова В.А., Демчук Т.Л., Григорюк І.А., Ємець А.І., Пономаренко С.П., Галкін А.П., Блюм Я.Б. Повышение иммунозащитных свойств видов растений рода Aesculus L. к каштановой минирующей моли (Cameraria ohridella Deschka et Dimic) при помощи биостимулянта "Регоплант" // Биоресурсы и природопользование. – 2013. – 5, № 1–2. – С. 5–10.

С помощью метода молекулярной (Dot-блот) гибридизации si/miРНК с мРНК в листьях различных по устойчивости видов растений рода Aesculus L. к каштановой минирующей моли (КММ) впервые установлено более чем 50 % гомологии в спектрах (наборах) si/miРНК-основных составляющих регуляции генетических процессов на посттранскрипционном–трансляционном уровнях. Показано, что внутривидовые отличия в гибридизации si/miРНК с мРНК в листьях растений составляют 8–13 %, а междуродовые – 18–22 %. В листьях устойчивых к КММ растений степень гомологии в популяциях si/miРНК снижается, по сравнению с неустойчивыми, на 30–40 %. Использование биостимулянта "Регоплант" индуцирует повышение устойчивости растений к КММ путем уменьшения синтеза специфических иммуносоставляющих si/miРНК. Уровень синтеза противпатогенных либо противопаразитарных si/miРНК в клетках рекомендовано использовать как генетический маркер для определения устойчивости растений к КММ.

SUMMARY

V. Tsygankova, T. Demchuk, I. Hrygoriuk, A. Yemets, S. Ponomarenko, A. Galkin, Ya. Blium. Increase of immune-protective properties of plant varieties of genus Aesculus L. to chestnut mine moth (Cameraria ohridella Deschka et Dimic) using biostimulant "Regoplant" // Biological Resources and Nature Management. – 2013. – 5, № 1–2. – P. 5–10.

Using the molecular hybridization method (DOT-blot) of si/miRNA with mRNA for the leaves, different in resistance, of kinds of plants of genus Aesculus L. to chestnut mine moth (CMM) it is the first time that more than 50 % homology in spectra (sets) of si/miRNA, which is the main constituent part of genetic processes regulation at posttranscriptional–translation levels, has been set. It is found that intragenetic differences in hybridization of si/miRNA with mRNA in plant leaves reach up to 8–13 %, and intergeneric – 18–22 %. The plant leaves resistant to CMM have a 30–34 % lower level of homology in si/miRNA populations compared to the irrisistant ones. Using biostimulant "Regoplant" induces an increase in plant resistance to CMM by decreasing synthesis of specific si/miRNA immune-constituents. The level of synthesis of antipathogenic or antiparasitic si/miRNA at cells is recommended to be used as a genetic marker to indentify plant resistance to CMM.