

В. А. Циганкова

## Генетичні механізми успадкування стійкості пшениці та нуту до патогенних мікроміцетів роду *Fusarium* L.

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

Досліджено *in vivo* успадкування стійкості до патогенних мікроміцетів (*Fusarium graminearum* і *F. oxysporum* f. *ciceris*) рослин пшениці та нуту наступного покоління, отриманих з насіння рослин першого покоління, які в процесі онтогенезу оброблялись на інфекційному фоні регуляторами росту Біолан, Регоплант та Стімпо. За морфологічними показниками виявлено гетерозисподібний ефект стійкості до патогенів у досліджуваних проростків пшениці та нуту. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу з використанням методу дот-блот-гібридизації встановлено істотну різницю у відсотку гомології *si/mi*РНК з імунозахисними властивостями досліджуваних до мРНК контрольних рослин.

Майже в усіх країнах рослинництво потерпає від шкідливих організмів: комах і кліщів, мікроорганізмів (бактерій, грибів, вірусів), нематод (фітогельмінтів) та бур'янів [1]. Особливо значних збитків виробництву зерна пшениці, ячменю, вівса, кукурудзи та інших зернових культур протягом останніх 20 років завдають хвороби, що спричинюються патогенними мікроміцетами роду *Fusarium*, у тому числі *Fusarium graminearum* L. (статеві стадії розвитку — *Gibberella zeae*), а також *F. oxysporum* f. *ciceris*, що уражає зернобобову культуру нут (*Cicer arietinum*), яка є важливою для сільського господарства країн Західної та Середньої Азії, Північної Африки, а також Північної Америки [1, 2]. За даними ФАО, підвищення ураження посівів зернових культур спостерігається в різних країнах. Наприклад, в США недобір врожаю від цього захворювання призвів до економічного збитку в 1 млрд у 1993 р. та в 500 млн дол. США у 1994 р., не менші щорічні економічні збитки спостерігаються в Китаї, Канаді, країнах Південної Америки, а також в Україні, де ураження сільськогосподарських посівів цими патогенами сягає 70–80% [1, 3–5]. Шкідливість фузаріозного ураження зернових культур виявляється і в зниженні харчових якостей насіння. Патології рослин є небезпечними для здоров'я людини і сільськогосподарських тварин внаслідок накопичення мікотоксинів у рослинах, які не можуть бути використаними на корм худобі для отримання якісного м'яса, молока та продуктів його переробки. До небезпечних мікотоксинів, які продукує *F. graminearum* L., належать дезоксиніваленол (ДОН), зеараленон, фузарин С, а також ауурофузарин [3, 5, 6]. Основним механізмом дії мікотоксину ДОН є пригнічення біосинтезу білка в життєво важливих органах людини та тварин. Споживання мікотоксину зеараленону підвищує рівень естрогенів в організмі людини, а також у великої рогатої худоби і свиней [3, 7]. У країнах Євросоюзу рівень максимальної концентрації ДОН обмежено до 0,5 мкг/г зернових культур [8], тоді як у США — до 1 мкг/г харчових продуктів [3]. Велика лабільність мікроміцетів роду *Fusarium* L. до факторів навколишнього середовища та неконтрольоване застосування високотоксичних фунгіцидів призвело до збільшення різних видів *Fusarium* завдяки послабленню конкурентної боротьби між різними видами патогенів.

Проблема захисту сільськогосподарських рослин від фузаріозу є дуже актуальною для України. В Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України спільно із Держав-

ним підприємством “Міжвідомчий науково-технологічний центр “Агробіотех” НАН і МОН України створені нові екологічно безпечні композиційні полікомпонентні препарати із біозахисним ефектом Біолан, Регоплант та Стімпо, які вміщують продукти метаболізму в культурі *in vitro* гриба-міксоміцету, виділеного з кореневої системи женьшеню, та ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis* [1]. Проведені нами молекулярно-генетичні дослідження [9, 10] показали, що ці препарати значно підвищують стійкість рослин до різних патогенів завдяки стимуляції ними синтезу в рослинах малих регуляторних si/miРНК, які в процесі посттранскрипційного сайленсингу генів (PTGS) або блокують трансляцію недосконалик за структурою власних мРНК та мРНК патогенів, або шляхом ферментативного розщеплення їх знищують [11].

Метою дослідження було з’ясування молекулярно-генетичних механізмів підсилення за допомогою регуляторів росту рослин Біолан, Регоплант та Стімпо імунозахисних властивостей та стійкості до патогенних мікроміцетів роду *Fusarium* L. пшениці і нуту.

У досліджах визначали позитивні або негативні наслідки обробки рослин першого покоління регуляторами росту Біолан, Регоплант та Стімпо на інфекційному фоні на ростові і молекулярно-генетичні показники рослин наступного покоління, що вирощувались вже без регуляторів росту та на безінфекційному фоні (тобто вивчали наслідки післядії регуляторів росту як імуномодуляторів). У досліджах використовували два сорти різних за низкою фізіологічних ознак нуту — “Розанна”, “Тріумф” та два сорти пшениці “Ластівка”, “Княгиня Ольга”, насіння яких було нам люб’язно надане д. б. н. О. В. Бабаянц (Селекційно-генетичний інститут — НЦНС, м. Одеса).

Насіння рослин пророщували в чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою. Визначали інтегральні показники росту та розвитку проростків і молекулярно-генетичні показники — відсоток гомології основних складових імунної системи: si/miРНК рослин (які виділяли з насіння вказаних рослин пшениці та нуту першого покоління, що вирощувались на інфекційному фоні в присутності *F. graminearum* і *F. oxysporum f. ciceris* відповідно, та оброблялись регуляторами росту) до мРНК, виділених із контрольних проростків (які вирощувались з насіння рослин пшениці та нуту першого покоління, що не оброблялись регуляторами росту, але розвивались на інфекційному фоні). Малі регуляторні si/miРНК виділяли з рослин за допомогою розробленого нами раніше методу [9, 10]. Специфічність післядії регуляторів росту визначали за різницею в ступені гомології між si/miРНК та мРНК у контрольних і дослідних рослин пшениці та нуту різних сортів.

За інтегральними показниками швидкості проростання насіння та швидкості росту проростки, отримані з насіння рослин обох сортів нуту, інфікованих патогенним мікроміцетом *F. oxysporum f. ciceris*, та проростки, отримані з насіння обох сортів пшениці, інфікованих патогенним мікроміцетом *F. graminearum*, які обробляли регуляторами росту Біолан, Регоплант та Стімпо, різко випереджали ріст та розвиток контрольних проростків, отриманих з насіння рослин, що вирощувались без регуляторів на інфекційному фоні (рис. 1, 2).

Починаючи вже з 5-ї доби до 7-ї доби від початку пророщування ростові показники дослідних проростків майже втричі перевищували контрольні показники. Це свідчить про підвищення життєздатності нового покоління рослин завдяки обробці регуляторами росту та наявності високого біологічного потенціалу насіння нуту, одержаного з рослин, що оброблялись регуляторами росту, незважаючи на те, що рослини першого покоління вирощувались на інфекційному фоні. Для більшої наочності типові розміри контрольних та дослідних проростків нуту, взятих з чашок Петрі *a* та *b* (див. рис. 2) відповідно, наведе-

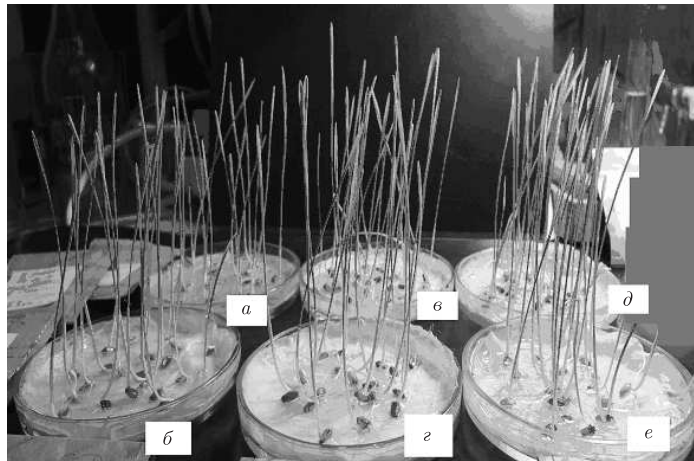


Рис. 1. 7-добові проростки рослин пшениці (сорту “Ластівка”):  
 а, б — проростки, отримані з насіння рослин, необроблених регуляторами росту (контроль); в, г — проростки, отримані з насіння рослин, оброблених регулятором росту Стімпо; д, е — проростки, отримані з насіння рослин, оброблених регулятором росту Регоплант

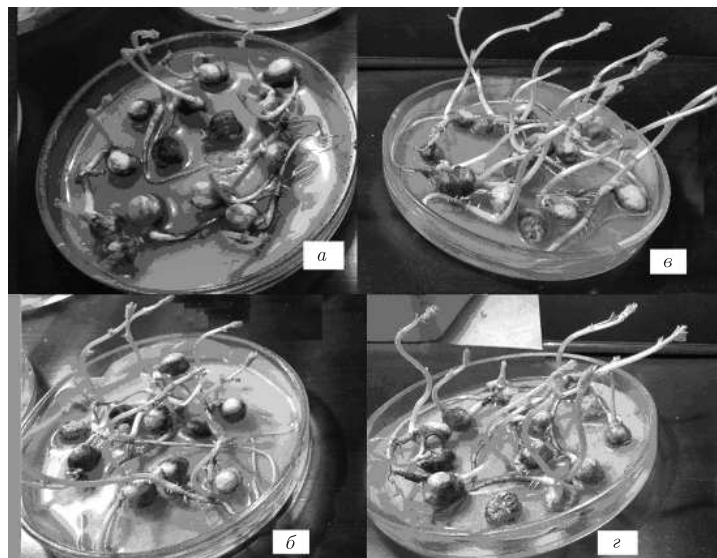


Рис. 2. 7-добові проростки рослин нуту (*Cicer arietinum* L.) (сорту “Тріумф”):  
 а — проростки, отримані з насіння рослин, необроблених регуляторами росту (контроль); б — проростки, отримані з насіння рослин, оброблених регулятором росту Стімпо; в — проростки, отримані з насіння рослин, оброблених регулятором росту Регоплант; г — проростки, отримані з насіння рослин, оброблених регулятором росту Біюлан

но на рис. 3. Поясненням різниці в ростових показниках між контрольними та дослідними рослинами можуть бути результати молекулярно-біологічних дослідів (табл. 1.)

Наведені в табл. 1 дані свідчать на користь того факту, що проростки, отримані з насіння рослин першого покоління, які в період вегетації оброблялись регуляторами росту Біюлан, Регоплант та Стімпо на інфекційному фоні (у присутності патогенних мікроміцетів *F. graminearum* та *F. oxysporum f. ciceris*), за інтегральними показниками проростання, росту і розвитку виявляють вищу життєздатність порівняно з контрольними проростками



Рис. 3. Порівняльні розміри 7-добових проростків нуту (*Cicer arietinum* L.), отриманих з насіння рослин, оброблених (а) та необроблених (б) у період вегетації регулятором росту Регоплант на інфекційному фоні (*Fusarium oxysporum* f. *ciceris*)

(отриманими з насіння інфікованих рослин першого покоління, що не оброблялись регуляторами росту).

Значну різницю встановлено також і за молекулярно-генетичними показниками, а саме у всіх варіантах дослідів відсоток гомології між імунізаційними si/miРНК (що виділяли з проростків, отриманих з насіння інфікованих та оброблених регуляторами росту рослин першого покоління) та мРНК (виділених з контрольних рослин) значно відрізняється. Можна спостерігати і сортові відмінності в ефектах післядії різних регуляторів росту (за різницею в ступені гомології між si/miРНК та мРНК у контрольних і досліджуваних рослин пшениці та нуту різних сортів). Отримана різниця у вищезазначених показниках підтверджує:

1) в ембріогенезі в процесі формування насіння рослин відбувається часткове перепрограмування геному зародків насіння рослин шляхом переключення одних адаптаційних генів на інші в сімействах генів одного й того ж функціонального призначення, але специфічних щодо конкретних фізіологічних умов, що сформовані під впливом стимуляторів росту;

Таблиця 1. Рівень дот-блот-гібридизації si/miРНК з мРНК контрольних та дослідних рослин пшениці та нуту, %

Варіант дослідів	Пшениця		Нут	
	“Ластівка”	“Княгиня Ольга”	“Розанна”	“Тріумф”
Контроль (si/miРНК та мРНК з контрольних рослин)	98 ± 1,4	98 ± 1,6	98 ± 1,2	98 ± 1,4
Обробка регулятором росту				
Біолан	—	—	86 ± 1,6* (~12%)	82 ± 1,8* (~16%)
Регоплант	82 ± 1,6* (~16%)	84 ± 1,4* (~14%)	78 ± 1,4* (~20%)	80 ± 1,6* (~18%)
Стімпо	86 ± 1,2* (~12%)	88 ± 0,96* (~10%)	88 ± 0,98* (~10%)	76 ± 2,42* (~22%)

Примітка. Наведено результати з трьох дослідів; \* — наявність достовірних відмін від контролю,  $p < 0,05$ .

2) висока життєздатність, що проявляється у рослин другого покоління, мабуть, також обумовлена запобіганням регуляторами росту проникненню патогенних організмів в насіння в період його формування та дозрівання і накопиченню продуктів їх життєдіяльності — токсинів.

Наведені результати узгоджуються з даними наших попередніх досліджень [9, 12, 13], а також даними інших робіт, що вказують на існування гнучкої системи перепрограмування геному клітин рослин під впливом регуляторів росту як на різних стадіях онтогенезу [14], так і при формуванні адаптаційних механізмів стійкості рослин до різних патогенних організмів [15].

Таким чином, результати проведених експериментів свідчать на користь механізму епігенетичного успадкування стійкості до патогенних мікроміцетів роду *Fusarium* L. досліджуваними рослинами пшениці та нуту наступного покоління, отриманих з насіння рослин першого покоління, які оброблялись на інфекційному фоні регуляторами росту з біозахисними властивостями Біолан, Регоплант та Стімпо.

1. Пономаренко С. П., Терек О. И., Грицаенко З. М. и др. Биорегуляция роста и развития растений // Биорегуляция микробно-растительных систем. Гл. 4 / Под. ред. Г. А. Иутинской, С. П. Пономаренко. – Киев: Ничлава, 2010. – С. 251–291.
2. Leslie J. F., Summerell B. A. The *Fusarium* Laboratory manual. – Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006. – 372 p.
3. Trail F. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era // Plant Physiol. – 2009. – **149**. – P. 103–110.
4. Бабалянц Л. Т., Бабалянц О. В., Мирось С. Л., Тоцький В. Н. Генетическая детерминация и наследование признака устойчивости пшеницы к *Fusarium graminearum* // Цитология и генетика. – 2001. – **35**, № 3. – С. 22–29.
5. Geraldo M. R., Tessmann D. J., Kemmelmerier C. Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in Southern Brazil // Brazilian J. Microbiol. – 2006. – **37**. – P. 58–63.
6. Starkey D. E., Ward T. J., Aoki T. et al. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium head blight* species and trichothecene toxin diversity // Fungal Genet. Biol. – 2007. – **44**. – P. 1191–1204.
7. Utermark J., Karlovsky P. Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – **73**. – P. 637–642.
8. Landschoot S., Waegeman W., Audenaert K. et al. A field-specific web tool for the prediction of *Fusarium head blight* and DON content in Belgium // Abstracts of 64<sup>th</sup> Intern. Symp. of Crop Protection. – Ghent, Belgium, 2012. – P. 57.
9. Tsygankova V. A., Galkin A. P., Galkina L. O. et al. Gene expression under regulators' stimulation of plant growth and development // New plant growth regulators: basic research and technologies of application. Ch. 3/ Ed. S. P. Ponomarenko, H. O. Iutynska. – Kyiv: Nichlava, 2011. – P. 94–152.
10. Цыганкова 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.
11. Padmanabhan Ch., Zhang X., Jin H. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity // Curr. Opin. Plant Biol. – 2009. – **12**. – P. 465–472.
12. Цыганкова В. А., Мусатенко Л. И., Пономаренко С. П. и др. Изменение популяций функционально активных цитоплазматических мРНК в клетках растений под влиянием регуляторов роста и биотехнологические перспективы бесклеточных систем белкового синтеза // Биотехнология. – 2010. – **3**, № 2. – С. 19–32.
13. Цыганкова В. А., Пономаренко С. П., Галкин А. П. та ін. Особливості змін експресії генів в клітинах рослин під впливом екзогенних регуляторів росту // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. – Київ: Логос, 2009. – С. 576–584.
14. Нам И. Ян-Г. Оптимизация применения регуляторов роста и развития растений в биотехнологиях in vitro: Дис. ... д-ра биол. наук. – Москва, 2004. – 312 с.

15. Андреева Е. А., Ходжайова Л. Т. Изучение роли цитокининов в развитии признака устойчивости к болезням в модельной системе картофеля фитофтора // Тез. докл. 2-го съезда ВОГиС. – Ст.-Петербург, 2000. – Т. 1. – С. 275.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 01.06.2012

**В. А. Цыганкова**

### **Генетические механизмы наследования устойчивости пшеницы и нута к патогенному микромицету рода *Fusarium* L.**

*Исследовано in vivo* наследование устойчивости к патогенным микромицетам (*Fusarium graminearum* и *F. oxysporum* f. *ciceris*) растений пшеницы и нута последующего поколения, полученных из семян растений первого поколения, которые в процессе онтогенеза обрабатывались на инфекционном фоне регуляторами роста Биолан, Регоплант и Стимпо. По морфофизиологическим показателям установлен гетерозисподобный эффект устойчивости к патогенам у опытных проростков нута и пшеницы. Молекулярно-генетическим анализом с использованием метода дот-блот-гибридизации установлена значительная разница в проценте гомологии si/miРНК с иммунозащитными свойствами опытных к мРНК контрольных растений.

**V. A. Tsygankova**

### **Genetic mechanisms of wheat and chickpea inheritance of resistance to pathogenic micromycete of *Fusarium* L. genus**

*The inheritance of the resistance to pathogenic micromycetes (*Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* f. *ciceris*) of wheat and *Cicer arietinum* L. plants of the next generation obtained from the seeds of plants of the first generation, that were processed at the ontogenesis process by growth regulators Biolan, Regoplant, Stimpo against an infectious background is studied in vivo. According to the morpho-physiological indices, the heterosis-like effect of resistance to pathogens at experimental *Cicer arietinum* L. and wheat plants is found. The molecular-genetic analysis using the method of DOT-blot hybridization showed a considerable difference in the percent of homology si/miRNA with immune-protective properties of experimental plants to mRNA of control ones.*