

БІЛОНОЖКО Ю. О.[✉], ПОНОМАРЕНКО Л. О., РАБОКОНЬ А. М., ПОСТОВОЙТОВА А. С., КАЛАФАТ Л. О., ПРИВАЛІХІН С. М., БЛЮМ Я. Б., ПІРКО Я. В.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: tkacheva_ua@ukr.net

[✉] tkacheva_ua@ukr.net

ПОШИРЕННЯ У КИЄВІ ОМЕЛИ (*VISCUM ALBUM L.*), ЯКА ЗРОСТАЄ НА РІЗНИХ ВИДАХ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН, ТА ЇЇ ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ

Мета. Метою роботи було дослідження видового різноманіття і ступеня ураження дерев-живителів омелою білою (*Viscum album L.*), а також вивчення генетичних особливостей омели у зелених насадженнях м. Києва. **Методи.** Використовували метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Ампліфіковані фрагменти ДНК фракціонували за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі. Смуги ДНК детектували шляхом фарбування нітратом срібла. **Результати.** Досліджено видове різноманіття дерев-живителів *V. album* у межах м. Києва, серед них – рослини роду *Pinus* та покритонасінні рослини, які належать до 8 родів (*Acer*, *Fraginus*, *Asacia*, *Populus*, *Tilia*, *Salix*, *Malus*, *Sorbus*). 47 % інфікованих дерев серед цих живителів припадає на рослини роду *Acer*. Виявлено, що серед інфікованих дерев 30 % мали важкий ступінь ураження напівпаразитом, 28 % – середній та 42 % – слабкий. На підставі аналізу поліморфізму ДНК-маркерів отримано молекулярно-генетичні профілі *V. album*, яка зростає на різних видах дерев-живителів. **Висновки.** Серед досліджених дерев-живителів *V. album* найбільший відсоток інфікованих рослин у межах Києва (47 %) припадає на рослини роду *Acer*. Омела біла, що зростає на покритонасінних деревах, характеризується більшим ступенем генетичного поліморфізму, ніж та, що зростає на голонасінних.

Ключові слова: *Viscum album L.*, рослина-живитель, інтрони генів, поліморфізм довжини, β -тубулін.

Омела біла (*Viscum album L.*) – вічнозелена напівпаразитарна рослина, яка зростає на гілках та стовбурах деревних рослин, заселяючи велику кількість різноманітних деревних порід переважно без чіткої спеціалізації. Однак деякі підвиди здатні проявляти високу специфічність до виду рослини-живителя [1]. Природний ареал

V. album охоплює всю Європу, Азію та Північну Африку [2, 3]. Вона трапляється у Великобританії, Ірландії, Іспанії, Польщі, Скандинавії, Росії, Білорусі, Греції, Китаї, Японії, Північній Америці та Австралії [3, 4]. Широкого розповсюдження набула омела і на території України. На сьогодні омела біла вже вважається справжнім екологічним лихом Києва, Харкова, Івано-Франківська, Полтави, Білої Церкви, Черкас, Умані тощо [5]. Зокрема, збільшення поширення омели білої може бути пов'язано зі змінами клімату. Крім того, омела біла добре пристосовується до дуже зміненого та урбанізованого середовища великих міст, через те її можна розглядати як синантропний вид [6].

Численні дослідження у різних країнах світу присвячені визначенню видів деревних рослин, на яких може паразитувати *V. album*. Крім того, виявлені рослини, які досить рідко заражуються омелою або здатні чинити опір закріпленню рослини-паразита на своїх гілках [7]. Незважаючи на широкий спектр деревних рослин, на яких паразитує омела біла, відомості про види, яким рослина-напівпаразит віддає перевагу в насадженнях, досить суперечливі. Так, у Каліфорнії (США) та м. Лодзі (Польща) омела найчастіше трапляється на клені сріблястому (*Acer saccharinum L.*), у Чеській Республіці – на представниках роду тополя (*Populus*), а у Києві (Україна) – на клені гостролистому (*Acer platanoides L.*) [8]. Таким чином, визначення видів, яким омела біла віддає перевагу в насадженнях, є актуальним сьогодні.

Оселяючись на рослині, омела спричиняє уповільнення росту, передчасну дефоліацію, зменшення площі фотосинтезуючих тканин, зміни у водному та вуглецевому балансі дерев-живителів, а це неминуче призводить до зниження стійкості деревних рослин до інших пошкоджуючих факторів [8, 9]. Однак контроль за розповсюдженням омели не може зводитися до

її суцільного винищення. Доведено, що вона відіграє важливу роль у забезпеченні біорізноманіття та стійкості міських екосистем [4]. За співіснування рослини з омелою спостерігається специфічний симбіоз, тобто співжиття двох організмів, яке має значний вплив на обидва види. Крім того, ця рослина має великий як науковий, так і практичний інтерес для фахівців різних галузей, адже в усіх частинах рослини *V. album* синтезуються та накопичуються різноманітні хімічні речовини (алкалоїди, флавоноїди, феноли, аміни, терпени, віскотоцин, лецитин, теонін, вітамін С, гістамін та інші), більшість із яких має певний інтерес для медицини [10, 11].

Однак, незважаючи на великий науковий та економічний інтерес до *V. album* як фахівців у галузі лісового господарства, так і фармацевтичної промисловості, виявленню генетичних особливостей цього виду приділяється мало уваги [12]. Переважна більшість таких досліджень присвячена уточненню систематичних та філогенетичних питань [13]. Різниця на молекулярно-генетичному рівні між *V. album*, що зростає на різних видах рослин-живителів, досі не з'ясована.

Наразі однією з відносно нових, надійних та стабільно працюючих у різних видів вищих рослин системою молекулярно-генетичних маркерів вважається маркерна система, що заснована на визначенні поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (TBP, Tubulin Based Polymorphism) [14]. Ця система маркерів є достатньо стабільною та специфічною, що зумовлює можливість її використання в генетичному аналізі рослин [15]. Зважаючи на вищесказане, метою роботи стало дослідження видового різноманіття і ступеня ураження дерев-живителів омели білої та вивчення її генетичних особливостей у зелених насадженнях м. Києва.

Матеріали і методи

У ході проведення досліджень було виявлено та проаналізовано 64 дерева з різним ступенем ураження омелою білою. Збір рослинного матеріалу здійснено з 5 пробних ділянок у межах Києва (насадження у Оболонському, Подільському, Шевченківському та Дніпровському районах, а також у лісництві Пуца-Водиця). Під час збору матеріалу визначався ступінь ураження дерев. За рівнем інфікованості розподіл рослин проводився за 4 рівнями: 0 – інвазія відсутня; I (слабке) – початок інвазії (1–5 кущів омели в кроні); II (середнє) – розвиток інвазії (6–20

кущів омели); III (важке) – завершення інвазії (понад 20 кущів омели) [16].

Геномну ДНК екстрагували з листя омели за допомогою ЦТАБ-методу [17]. Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» із визначенням концентрації та ступеня забруднення ДНК. Зразки ДНК зберігали за -20 °С. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну проводили згідно з [14]. Послідовності праймерів для проведення полімеразної ланцюгової реакції було взято з наукових літературних джерел [18]:

TBP-F: 5' – AACTGGGCBAARGGNCAYTAYAC-3';

TBP-R: 5'- ACCATRCAYTCRTCDGCRT-TYTC -3'.

Кожну реакцію проводили як мінімум в двократній повторності з використанням негативного контролю, щоб за подальшого електрофоретичного аналізу мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації, які відрізняються між однаковими реакціями. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1 x TBE-буфері. Візуалізацію фрагментів проводили шляхом фарбування нітратом срібла. Після електрофорезу гель фотографували у видимому світлі. Аналіз зображень електрофоретичних гелів проводили в програмі GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких бендів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва). Фрагменти ДНК записували в бінарній системі: наявність – одиниця, відсутність – нуль.

Результати та обговорення

Незважаючи на проведення щорічних санітарних різок, *V. album* на території м. Києва трапляється повсюди (лісові масиви, зелені насадження в різних районах міста, парки та кладовища, господарські маєтки, сади). Як відомо, омела здатна селитися на досить широкому спектрі як листяних, так і хвойних порід, віддаючи перевагу чужорідним та інтродукованим видам [1, 4]. Однак, за яким принципом деякі рослини-хазяїни вражаються більш інтенсивно, ніж інші, досі залишається не з'ясованим питанням.

Серед зібраних зразків на території м. Києва до хвойних порід рослин-живителів *V. album*

належав лише один вид (*Pinus sylvestris* L.). На частку рослин *P. sylvestris* припадало 16 %. Серед листяних порід спостерігалось значне різноманіття. Так, 47 % рослин-хазяїнів склали види роду *Acer*, 11 % – *Fraxinus*, 11 % – *Acacia*, 6 % – *Populus*, по 3 % – *Tilia* та *Salix*, 2 % – *Malus*, 1 % – *Sorbus*.

Під час збирання біологічного матеріалу, крім видової приналежності, оцінювали ступінь інфікованості рослини-живителя, оскільки сусідні дерева одного і того ж виду можуть мати різний ступінь інфікованості омелою. Це може бути пов'язане з різною привабливістю (зручністю) рослини для відпочинку птахів, які переносять насіння. Крім того, на успішність прикріплення насіння та проростання гаусторій впливає якість кори. Оскільки насіння омели повинне міцно триматися за поверхню, щоб проросток міг проникнути в середину живих тканин, невеликі відмінності в фізичних або хімічних властивостях кори, очевидно, можуть створювати велику різницю в успішності інфікування.

Серед обстежених насаджень високий ступінь інфікування мали 30 % дерев, вражених омелою, 28 % припадає на середній та 42 % на слабкий. Зрідка на дереві спостерігалися поодинокі кущі, найбільша кількість омели на одному дереві складала 45 кущів. Усі дерева, використані у дослідженні, були живими, хоча на деяких деревах спостерігалось багато сухих гілок.

Переважає більшість зразків була зібрана з листяних видів дерев, і, ймовірно, вони відносяться до підвиду омели листяних порід, однак науковий інтерес викликає те, чи відрізняються геноми цих зразків залежно від виду рослини-хазяїна. Оскільки всі омели є паразитами (або напівпаразитами), вони здатні утворювати тривалий, тісний фізіологічний зв'язок із рослиною, на якій оселяються, що має фенотипічні, а зрештою і генетичні наслідки для обох симбіонтів [19]. Генетична адаптація до рослин, на яких поселяється омела, важлива для еволюції паразитів. За поступової спеціалізації до дерев певного виду популяції паразитів можуть стати диференційованими расами. Тому важливим завданням є вивчення генетичних особливостей *V. album*, які надають перевагу різним деревам-живителям.

Генетичні особливості *V. album*, що паразитує на різних видах рослин-живителів, досліджували у 10 зразках омели, що зростала на *P. sylvestris*, та 15 зразках, що зростали на різних родах покритонасінних рослин, а саме *Populus*,

Tilia, *Acacia*, *Acer*, та *Malus* (рис.). Загалом результати ТВР-аналізу зразків омели білої свідчать про те, що утворюються амплікони, які містять інтрони генів β -тубуліну у діапазоні приблизно від 280 п. н. до 2000 п. н. Однак у зоні від 1000 до 2000 п. н. всі фрагменти є нечіткими та не мають 100 % відтворюваності. Цілком можливо, що ці амплікони є неспецифічними продуктами ПЛР. Враховуючи це, аналізували лише фрагменти в діапазоні від 280 п. н. до 900 п. н. (рис.). Основна зона поліморфізму знаходиться у межах 280 п. н. – 400 п. н. у всіх зразках та 550 п. н. – 700 п. н. у зразках, що зростають на досліджуваних видах покритонасінних.

Проаналізовані зразки чітко диференціюються один від одного як між двома групами (омела з сосни та омела з покритонасінних видів), так і в межах кожної окремої групи. Серед зразків, які паразитують на сосні, відмінний ТВР-профіль мають лише рослини № 1, 4, 8. Так, тільки у зразка №1 наявний фрагмент ДНК довжиною 817 п. н., а у зразків № 4 та № 8 – 280 п. н.

Зразки омели, що зростають на різних видах покритонасінних рослин, є більш варіабельними (поліморфними) та різняться не тільки між різними типами дерев, але й у межах кожного окремого виду рослини-хазяїна. Для кожного окремого зразка характерна наявність у середньому 5 фрагментів ДНК. Загалом усі рослини омели, які зростають на покритонасінних видах, характеризуються унікальним набором ампліконів, що дозволяє диференціювати їх з високим відсотком достовірності. Таким чином, омела біла, яка зростає на деревах покритонасінних видів, характеризується більшим ступенем генетичного поліморфізму, ніж та, що зростає на сосні звичайній.

Висновки

У результаті проведеної роботи досліджено видове різноманіття дерев-живителів *V. album* та оцінено ступінь їх інфікованості в межах м. Києва. Зафіксовано поновлення інфекції після санітарної обрізки дерев комунальними службами. На підставі аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну виявлені відмінності у генетичних профілях омели білої з різних порід дерев. При цьому омела біла, що зростає на покритонасінних видах, характеризується більш високим ступенем генетичного поліморфізму, ніж та, що зростає на голонасінних деревах.

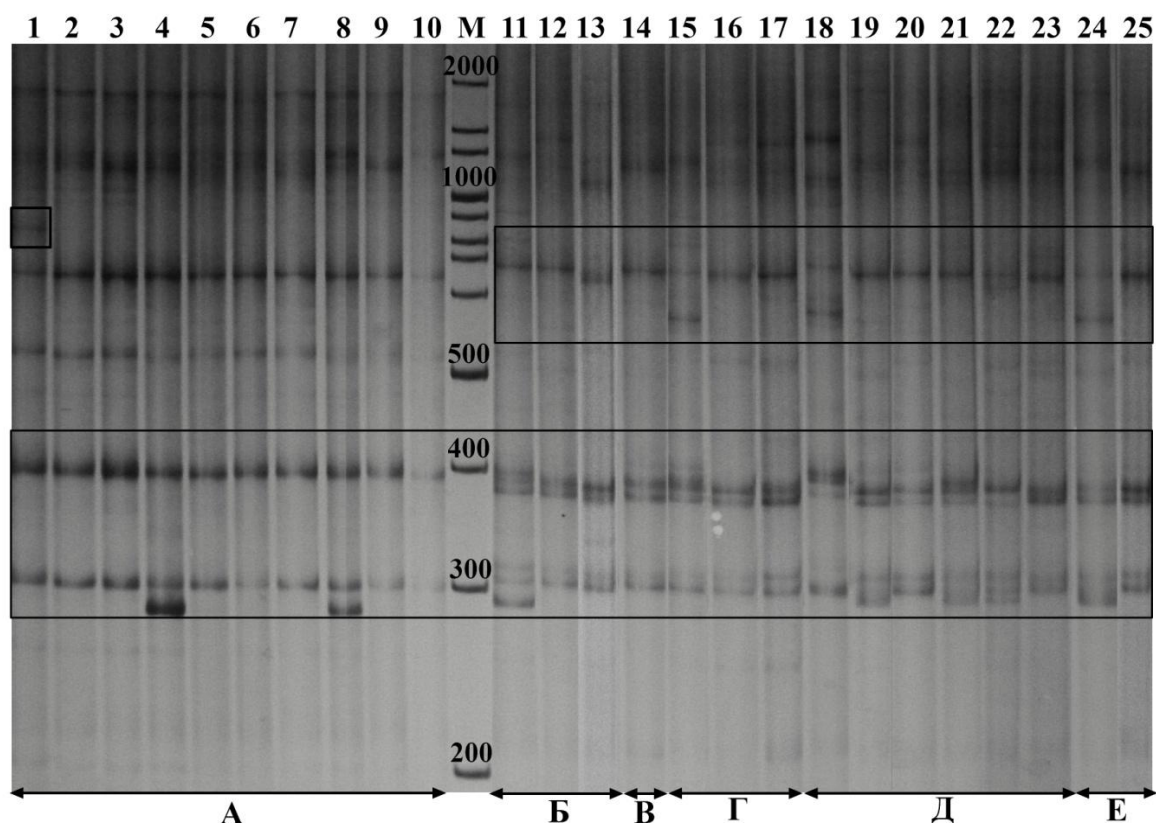


Рис. Молекулярні ТВР-профілі омели, яка зростає на різних видах рослин у м. Київ: м – ДНК-маркер «100bp Ladder»; 1–25 (зверху) – номери зразків *V. album* із дерев різних родів: А – *Pinus*, Б – *Populus*, В – *Tilia*, Г – *Acacia*, Д – *Acer*, Е – *Malus*. Прямокутниками позначені зони найбільшого поліморфізму.

References

- Ahmed Z., Dutt H.C. Restriction of *Viscum album* to few phorophytes in a habitat with diverse type of tree species. *Austin J. Plant Biol.* 2015. Vol. 1 (2). P. 101–105.
- Zuber L.D. Biological flora of Central Europe: *Viscum album*. *Flora*. 2004. Vol. 199. P. 181–203. doi: 10.1078/0367-2530-00147.
- Barberaki M., Dermitzaki E., Margioris N., Theodosaki M., Grafakos St., Kintzios Sp. Protein extracts from somaclonal mistletoe (*Viscum album* L.) callus with increased tumor cytotoxic activity *in vitro*. *Curr. Bioact. Compounds*. 2015. Vol. 11 (2). P. 104–108. doi: 10.2174/1573407211666150602215615.
- Kolodziejek J., Patykowski J., Kolodziejek R. Distribution, frequency and host patterns of European mistletoe (*Viscum album* subsp. *album*) in the major city of Lodz. *Poland Biologia*. 2013. Vol. 68 (1). P. 55–64. doi: 10.2478/s11756-012-0128-4.
- Galkin S.I., Dragan N.V., Doyko N.M., Pidorych Yu.V. Mistletoe in the relations system of “host-parasite”. *Plant Introduction*. Vol. 3. P. 71–78. [in Ukrainian] / Галкін С.І., Драган Н.В., Дойко Н.М., Пидорич Ю.В. Омела в системі відносин «господар-паразит». *Інтродукція рослин*. 2017. Т. 3. С. 71–78.
- Zachwatowicz M., Petrović K., Sudnik-Wójcikowska B. The occurrence of European mistletoe under the conditions of high human impact in the central part of Warsaw, Poland. *Problemy Ekologii Krajobrazu*. 2008. Vol. 22. P. 101–114.
- Zuber D., Widmer A. Genetic evidence for host specificity in the hemiparasitic *Viscum album* L. (Viscaceae). *Mol. Ecol.* 2000. Vol. 9. P. 1069–1073. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.00963.x.
- Rybalka I.O., Vergeles Yu.I. Some patterns of spatial distribution of the white mistletoe (*Viscum album* L.) in the urban area of the city of Kharkiv. *Sci. Bull. UNFU*. 2016. Vol. 26. P. 145–151. [in Ukrainian] / Рыбалка І. О., Вергелес Ю. І. Особливості поширення омели білої (*Viscum album* L.) на території міста Харкова. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2016. Т. 26. С. 145–151.
- Barbu C.O. Impact of white mistletoe (*Viscum album* ssp. *abietis*) infection on needles and crown morphology of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Not. Bot. Horti Agrobi.* 2012. Vol. 40 (2). P. 152–158. doi: 10.15835/nbha4027906.
- Halenar M., Tvirda E., Baldovska S., Ondruzka L., Massanyi P., Kolesarova A. *In vitro* effects of *Viscum album* on the functionality of rabbit spermatozoa. *Engineer. Technol. Int. J. Animal Veterinary Sci.* 2017. Vol. 11 (2). P. 108–112.
- Srdic-Rajic T., Tisma-Miletic N., Cavic M., Kanjer K., Savikin K., Galun D., Konic-Ristic A., Zoranovic T. Sensitization of K562 leukemia cells to doxorubicin by the *Viscum album* extract. *Phytother. Res.* 2016. Vol. 30 (3). P. 485–495. doi: 10.1002/ptr.5554.
- Mejnartowicz L. Relationship and genetic diversity of mistletoe (*Viscum album* L.) subspecies. *Acta Soc. Bot. Poloniae*. 2006. Vol. 75 (1). P. 39–49. doi: 10.5586/asbp.2006.007.

13. Piotrowski A., Ochocka J.R., Stefanowicz J., Luczkiewicz M. Molecular genetic survey of European mistletoe (*Viscum album*) subspecies with allele-specific and dCAPS type markers specific for chloroplast and nuclear DNA sequences. *Planta Medica*. 2003. Vol. 69 (10). P. 939–944. doi: 10.1055/s-2003-45104.
14. Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Giani S., Toschi M., Lowe C., Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*. 2004. Vol. 47. P. 281–291. doi: 10.1139/g03-132.
15. Rabokon A.N., Pirko Ya., Demkovych A., Blume Ya. Intron length polymorphism of beta-tubulin genes as an effective instrument for plant genotyping, *Mol. Appl. Genetics (Minsk)*. 2015. Vol. 19. P. 35–44. [in Russian] / Рабокoнь А.Н., Демкович А.Е., Пiркo Я.В., Блюм Я.Б. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. *Мол. прикл. генетика*. 2015. Т. 19. С. 35–44.
16. Hnatyuk O.M., Kavun E.M. Features of distribution of white mistletoe in park and recreation zones of Forest-steppe and Polissya. *Visnyk Zhytomyrs'koho natsional'noho ahroekolohichnoho universytet*. 2016. Vol. 2 (1). P. 183–192. [in Ukrainian] / Гнатюк О. М., Кавун Е. М. Особливості розповсюдження омели білої в паркових і рекреаційних зонах Лісостепу та Полісся. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*. 2016. Т. 2 (1). С. 183–192.
17. Green M.R., Sambrook J. Molecular cloning. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1890 p.
18. Breviario D., Baird W.V., Sangoi S., Hilu Kh., Blumetti P., Giani S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined β -tubulin introns. *Mol. Breed.* 2007. Vol. 20 (3). P. 249–259. doi: 10.1007/s11032-007-9087-9.
19. Webster J. Parasitism: the ecology and evolution of intimate interactions. *Parasitology*. 2002. Vol. 124 (4). P. 475–476. doi: 10.1017/S0031182002221836.

BILONOZHKO Yu. O., PONOMARENKO L. O., RABOKON A. M., POSTOVOITOVA A. S., KALAFAT L. O., PRIVALIKHIN S. M., BLUME Ya. B., PIRKO Ya. V.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osyrovskoho str., 2A, e-mail: tkacheva_ua@ukr.net

DISTRIBUTION OF MISTLETOE (*VISCUM ALBUM* L.), WHICH PARASITIZES DIFFERENT WOODY PLANTS SPECIES, IN KYIV AND ITS GENETIC CHARACTERISTICS

Aim. The aim of the work was to study the species diversity of mistletoe host trees with the establishment of damage degrees and the study of the mistletoe genetic characteristics in Kiev. **Methods.** The β -tubulin first intron length polymorphism evaluating method (TBP) was used. Amplified fragments DNA were fractionated by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel. DNA bands were detected using silver nitrate staining. **Results.** The species diversity of *Viscum album* L. host-trees was studied in Kiev. Among them, plants of the genus Pinus and angiosperms that belong to 8 genera (*Acer*, *Fraxinus*, *Acacia*, *Populus*, *Tilia*, *Salix*, *Malus*, *Sorbus*), wherein 47% belong to the genus Acer. It was revealed that among infected trees, 30% had severe damage to mistletoe, 28% moderate and 42% weak. Based on the analysis of DNA marker polymorphisms, the molecular-genetic profiles of *V. album*, which grows on various species of host trees, were obtained and analyzed. **Conclusions.** The species diversity of *V. album* host-trees was studied and the degree of their infection was assessed in Kiev. Mistletoe, which grows on angiosperms, is characterized by a greater degree of genetic polymorphism than that which grows on gymnosperms.

Keywords: *Viscum album* L., host-plant, introns of genes, length polymorphism, β -tubulin.