

## БІОТЕХНОЛОГІЯ ІНДУКУВАННЯ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ПШЕНИЦІ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ПРОТИ БІОТИЧНОГО СТРЕСУ

«Точкою росту» сучасної фітоімунології є розробка нових альтернативних способів захисту рослин, які дозволяють мінімізувати кількість хімічних обробок та зменшити залишкові концентрації пестицидів у складі готової сільськогосподарської продукції [2]. Одним з таких підходів є індукування природної стійкості рослин за допомогою індукторів (елісаторів) захисних реакцій. Раніше ми показали принципову можливість індукувати системну стійкість рослин пшениці проти біотичного стресу за допомогою щавлевої кислоти [4, 14].

Бура листкова іржа, збудник гриб *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, в Україні часто зустрічається у Лісостепу та на Поліссі. Ураження листків та півх рослин червоно-бурими пустулами призводить до зменшення асиміляційної поверхні та порушення водного балансу [8]. Метою роботи було розробити біотехнологію індукування хворобостійкості рослин пшениці проти біотрофних патогенів за допомогою комбінованої обробки біотичним елісатором (щавлевою кислотою) та сигнальною молекулою (оксидом азоту).

### Матеріали і методи

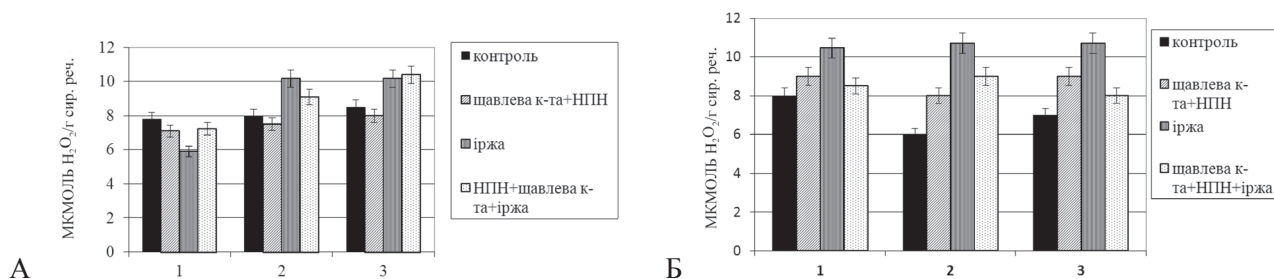
Об'єктом досліджень були два сорти озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. – Поліська 90 та Столична. Оригіном обох сортів є Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН України», при цьому сорт Поліська 90 був використаний при виведенні сорту Столична. Таким чином, нами було проведено порівняння стійкості вітчизняних сортів різних поколінь до грибних захворювань. Рослини вирощували на сірому лісовому ґрунті в Київській області з використанням типової для зони агротехніки. У польовому досліді рослини пшениці обприскували водним розчином щавлевої кислоти (0,1 мМ) та 0,5 мМ водним розчином донора оксиду азоту – нітропрусида натрію (НПН) у фазі виходу в трубку, після чого проводили інокуляцію збудником бурої іржі *P. recondita*. В якості маркера індукованої стійкості визначали вміст ендogenous пероксиду водню за реакцією з сульфатом титану [13]. Відбір зразків проводили після заражен-

ня протягом періоду колосіння-цвітіння та дозрівання зерна. Оцінку ураження та ступеня розвитку хвороби проводили у фазу молочно-воскової стиглості зерна, використовуючи 9-бальну шкалу Саарі та Прескотта (1988) [1]. У цей же період визначали морфометричні параметри – висоту рослин, довжину колоса та прапорцевого листка. Після дозрівання зерна проводили аналіз структури врожаю. Повторність дослідів триразова. Результати обробляли статистично з використанням ANOVA.

### Результати та обговорення

Процес зараження рослин збудником бурої іржі відбувається лише в краплині води і починається з проростання спор шляхом утворення ними росткових трубок. Інфекційна гіфа проникає у тканину рослини-господаря через продири. Протягом вегетації патоген формує кілька генерацій урединіоспор. Показано, що у сорту Столична вміст ендogenous пероксиду водню – головної сигнальної форми активного кисню – за дії донора оксиду азоту та щавлевої кислоти у фазі входу в трубку в умовах ураження збудником бурої іржі значно зростає (рис. 1 А). Його накопичення в клітинах може призводити до зміни в балансі між сульфгідрильними та дисульфідними групами білків, таких як протеїнкінази і фактори регуляції транскрипції, та до передачі стресового сигналу в геном [9, 11, 12]. Відомо, мембрани можуть обмежувати транспорт  $H_2O_2$  та генерувати градієнти і сигналінг з цитоплазми до внутрішніх компартментів.

$H_2O_2$  також продукується в окиснювальному вибуху, що забезпечує і вимагає постійного входу  $Ca^{2+}$ , який активує локалізовану в мембрані НАДФН-оксидазу. Збільшення концентрації кальцію спричиняє активацію його сенсору кальмодуліну і забезпечує передачу сигналу до каталази, яка регулює ендogenous рівень  $H_2O_2$ . Таким чином,  $Ca^{2+}$  виконує подвійну функцію у підтриманні гомеостазу  $H_2O_2$  в клітині. Дифузія  $H_2O_2$  через мембрани значно швидша, ніж  $O_2$ . Компартменталізація клітини забезпечує обмеження локалізації  $H_2O_2$  і формування його локаль-



**Рис.** Вплив обробки шавлевою кислотою та донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію за умов ураження збудником бурої іржі на вміст ендogenous пероксида водню в листках озимої пшениці сорту Столична (А) та Поліська 90 (Б) (1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна)

них рівнів. Універсальною відповіддю на  $H_2O_2$  є зростання експресії антиоксидантних ферментів.  $H_2O_2$  може взаємодіяти з цистеїновими та тіольними залишками білків, що спричиняє конформацію білків, впливає на їх активність білків. Пероксидази відновлюють  $H_2O_2$  до води і послідовно окиснюють вторинний відновник такий як глутатіон або аскорбат.  $H_2O_2$  здатен активувати каскад мітоген-активованих протеїнкіназ (МАПК) і забезпечувати зв'язок між сигналом  $H_2O_2$  і генною експресією [3, 12, 13].

NO разом з  $H_2O_2$  виконує роль сигнальної молекули у рослин. Його дія тісно пов'язана з активними формами кисню, сигнальними системами кальцію [2, 4, 5]. Показано, що NO стимулює видалення цитозольного  $Ca^{2+}$  із замикальних клітин проридів, інгібує  $K^+$ -канали у плазматичній мембранній АТФ-азі та активує аніонні канали, що спричиняє закривання проридів [7, 8, 10]. NO бере участь у регуляції клітинного циклу рослинної клітини, процесів диференціації і морфогенезу у рослин NO зв'язується з тіольними групами багатьох білків, а S-нітрозилювання розглядають як один з ключових аспектів передачі NO-сигналу. За мілімолярних концентрацій NO та  $H_2O_2$  є синергістами.

У сорту Столична у фазі виходу в трубку відзначено зниження вмісту ендogenous пероксида водню у інфікованих збудником *P. recondita*, що може бути наслідком проникнення патогену. Клітинна стінка виконує захисну функцію не лише як бар'єр, також як і джерело сигнальних молекул. У ході проникнення патогену через прориди, місця поранення та руйнування клітинної стінки запускається каскад захисних реакцій. Однак лігніфікація клітинної стінки може обмежувати проникнення гриба у рослинні тканини. Обробка шавлевою кислотою сумісно з донором оксиду азоту – НПН індукувала зростання вмісту ендogenous пероксида водню у фазі виходу в трубку

у інфікованих рослин. Це може бути пов'язано з окиснювальним вибухом та інтенсифікацією синтезу лігніну. Лігнін зміцнює клітинну стінку, роблячи її більш стійкою до механічного проникнення, дії ферментів гриба. У синтезі лігніну беруть участь пероксидази, а  $H_2O_2$  необхідний для окиснення оксикоричних спиртів.

У фазі колосіння-цвітіння, після закінчення інкубаційного періоду і початку прояву візуальних ознак грибного захворювання, показано, що у сорту озимої пшениці Столична вміст ендogenous пероксида водню зростає як наслідок активізації спротиву інфекції та одночасного формування клітинних стінок.

Наприкінці вегетаційного періоду, у фазі молочної стиглості зерна вміст ендogenous пероксида водню у рослин, оброблених шавлевою кислотою та НПН та інфікованих *P. recondita*, залишався на досить високому рівні.

У нестійкого до грибних захворювань сорту Поліська 90 виявлено високий рівень вмісту пероксида водню за умов ураження бурю іржею (рис. 1 Б). Однак у інфікованих рослин цього сорту, попередньо оброблених шавлевою кислотою та НПН, вміст ендogenous пероксида водню був близьким або навіть нижчим за значення необробленого варіанта. У фазах колосіння-цвітіння та молочної стиглості зерна попередня обробка окремо еліситором та окремо донором сигнальної молекули лише дещо знижувала, інколи в межах похибки, вміст ендogenous пероксида водню в уражених бурю іржею листках пшениці, однак їх сумісна дія виявила більш суттєвий вплив.

Однак у сорту Поліська 90 за дії еліситору та шавлевої кислоти у інфікованих рослин відбувалось зниження вмісту пероксида водню практично до рівня контролю у фазі молочно-воскової стиглості зерна. При цьому у фазу колосіння-цвітіння, за умов закінчення інкубаційного періоду патогенів та інтенсивного синтезу клі-

**Вплив обробки щавлевою кислотою та донором оксиду азоту (НПН) на морфометричні параметри та продуктивність рослин озимої пшениці за умов ураження бурюю іржею**

Сорт, варіант	Висота рослини, см	Довжина прапорцевого листка, см	Кількість зерен в колосі, шт	Продуктивність, ц/га
Столична, контроль	101,5 ± 2,0	20,0 ± 0,4	48 ± 2	50,0 ± 4,0
Столична, щавлева к-та+НПН	105,0 ± 2,0	22,7 ± 0,4	56 ± 3	63,4 ± 5,0
Столична, іржа	88,1 ± 2,0	17,0 ± 0,4	40 ± 2	45,0 ± 3,0
Столична, щавлева к-та+НПН+іржа	102,3 ± 2,0	21,1 ± 0,4	52 ± 2	54,0 ± 4,0
Поліська 90, контроль	94,3 ± 2,0	20,0 ± 0,4	38 ± 2	45,0 ± 4,0
Поліська 90, щавлева к-та+НПН	100,1 ± 2,0	21,0 ± 0,4	49 ± 2	56,0 ± 4,0
Поліська 90, іржа	78,7 ± 2,0	16,6 ± 0,4	37 ± 2	34,0 ± 3,0
Поліська 90, щавлева к-та+НПН+іржа	97,0 ± 2,0	22,3 ± 0,4	46 ± 2	50,0 ± 4,0

тинних стінок у рослин, формування вегетативних та генеративних органів відзначено найвищі значення вмісту пероксиду водню.

Показано, що дія елісатору знижувала ступінь ураження листків пшениці збудником бурюю іржі у обох сортів на 10–15 % в середньому (від 5 до 6 балів по шкалі). Максимальний розвиток бурюю іржі проявляється у фазу молочно-воскової стиглості зерна. У сприйнятливої сорту Поліська 90 у цей період відзначено у деяких інфікованих рослин скручування і передчасне відмирання листків внаслідок майже повного покриття листової поверхні пустулами. На листках більш стійкого сорту Столична подекуди формувалися хлоротичні плями, а пустули не завжди здатні були прорвати епідерміс листка. За обробки елісатором та донором сигнальної молекули відзначено у обох сортів зменшення покриття листків пустулами та передчасне старіння листового апарату.

За умов ураження збудником бурюю іржі у обох сортів відзначено зниження висоти рослин та довжини прапорцевого листка (табл.). Формування невиповнених зернівок та меншого числа зерен мало наслідком втрату загальної продуктивності пшениці, порівняно з контрольним варіантом. У стійкого сорту Столична ці втрати були меншими.

Однак обробка біотичним елісатором та донором сигнальної молекули стимулювала ростові процеси та збільшення зерен в колосі, що позитивно відбилося на обох сортах озимої пшениці.

**Висновки**

Щавлева кислота у поєднанні з донором оксиду азоту є ефективним індуктором неспецифічної стійкості у рослин озимої пшениці проти збудника бурюю іржі гриба *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Показано, що у слабостійкого сорту пшениці нижчі можливості для формування системної стійкості проти ураження. Зокрема, це стосується пулу ендogenous пероксиду водню, задіяного у процесах лігніфікації клітинних стінок та активації НАДФН-оксидазної сигнальної системи. У стійкого сорту Столична біотичний елісатор індуктував зростання вмісту ендogenous пероксиду водню. У мілімолярних концентраціях оксид азоту здатний бути синергістом пероксиду водню. Встановлено, що негативний вплив інфекції, проявлений найбільше у фазі молочно-воскової стиглості зерна у вигляді передчасного скручування та відмирання уражених листків і як наслідок – недостатньої реалізації продуктивного потенціалу рослин, може бути значно зменшений та/або попереджений перед обробкою біотичним елісатором. Внаслідок розпізнавання біотичних елісаторів відбувається активація захисних реакцій у рослин. Оскільки елісатори діють за тим же принципом, за яким рослини захищаються у природних умовах, їх практичне використання не буде порушувати екологічну рівновагу та дозволить зменшити залишкові концентрації пестицидів у продукції рослинництва.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бабаянц Л.Т., Мештергази А., Вехтер Ф. и др. Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах. – Прага: СЭВ, 1988. – 321 с.
2. Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиология растений. – 2003. – 50, № 3. – С. 465–474.
3. Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М., Полищук В.П. Индуцирование системной устойчивости у растений биогенными индукторами // Вісник Харківського націон. аграрного університету. Серія Біологія. – 2005. – № 3. – С. 24–36.
4. Жук І.В. Дмитриєв О.П. Участь щавлевої кислоти в індукції системної стійкості пшениці до збудника септоріозу // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2014. – 15. – С. 67–72.
5. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. Ферментативные источники активных форм кислорода в растительных клетках: регуляция активности и участие в стрессовых реакциях // Вісник Харківського національного аграрного університету Серія Біологія. – 2012. – Вип. 1 (25). – С. 6–22.
6. Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Салаяев Р.К. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений // Физиология растений. – 2011. – 58, № 2. – С. 177–185.
7. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
8. Bolton M.D., Kolmer J.A., Garvin D.F. Pathogen profile. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* // Molecular Plant Pathology. – 2008. – 9 (5). – P. 563–575
9. Breusegem F. Van, Vranova E., Dat J.F., Inze D. The role of active oxygen species in plant signal transduction // Plant Science. – 2001. – 161. – P. 405–414.
10. Chen L.-M., Kao C.-H. Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation // Bot. Bull. Acad. Sin. – 1999. – 40. – P. 283–287.
11. Kamilova F., Kravchenko L.V., Shaposhnikov A.I., Makarova N., Lugtenberg B. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate // Mol. Plant. Microbe Interact. – 2006 – 19, N 10. – P. 1121–1126.
12. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. TRENDS in Plant Science. – 2002. – 7, N 9. – P. 405–410.
13. Nakano Y., Asada K. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts // Plant Cell Physiol. – 1981. – 22. – P. 867–880.
14. Zhuk I.V., Lisova G.M., Dovgal Z.M., Dmitriev A.P. Induction of *Triticum aestivum* L. tolerance to *Septoria tritici* by oxalic acid // Modern Phytomorphology. – 2014. – 6. – P. 105–108.

## ZHUK I.V., DMITRIEV A.P.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: iren\_zhuk@mail.ru*

## THE BIOTECHNOLOGY OF WHEAT PLANT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) TOLERANCE ELICITATION AGAINST BIOTIC STRESS

**Aims.** The usage of biological elicitors for plant defense responses against plant pathogenic fungi may initiate tolerance of plants and prevent environmental pollution. The aim of research was to investigate the effect of combined action of oxalic acid and NO in elicitation of wheat systemic resistance against *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* agent during ontogenesis.

**Methods.** The content of endogenous hydrogen peroxide was measured in leaves of winter wheat plants varieties Poliska 90 and Stolychna upon treatment of oxalic acid and leaf rust infection during ontogenesis. The morphometric parameters, degree of plant lesion and yield structure were analyzed. **Results.** Results obtained suggest that biotic elicitor – oxalic acid induces two wheat cultivars (Stolychna and Poliska 90) defense responses against leaf rust agent *Puccinia recondita*. Initiation of defense responses in elicitor-treated plants occurs in a short period of time. The effect of oxalic acid treatment increased the hydrogen peroxide content. The effect of oxalic acid also increased the grain quantity in ear and plant height.

**Conclusions.** Biochemical nature of defense responses elicitation revealed an increase hydrogen peroxide content which induces lignin synthesis for mechanical strengthening of the cell wall.

**Keywords:** hydrogen peroxide, oxalic acid, NO, *Triticum aestivum* L., *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* leaf rust, plant defense responses.