

УДК 533.37:581.14:577.34

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА ФИТОАЛЕКСИНОВ В ИНФИЦИРОВАННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ВЕРТИЦИЛЛЕЗНОГО ВИЛТА ТКАНЯХ ХЛОПЧАТНИКА

И.Г. АХМЕДЖАНОВ

*Институт биоорганической химии Академии наук Республики Узбекистан
100125 Ташкент, ул. М. Улугбека, 83
e-mail: iskakhm@mail.ru*

Исследовано влияние предпосевной обработки семян хлопчатника красным светом и электромагнитным полем низкой частоты на содержание фунгитоксичных веществ фенольной природы — фитоалексинов в инфицированных возбудителем вертициллезного вилта проростках хлопчатника. Установлено, что фотостимуляция семян красным светом индуцирует фитоалексинообразование в инфицированных патогеном тканях хлопчатника в 1,5—2 раза эффективнее по сравнению с индуктором электромагнитной природы. Выявлена обратная зависимость между содержанием фитоалексинов в тканях проростков, полученных из обработанных и необработанных индукторами семян, и количеством растений с признаками поражения вилтом, что указывает на возможность использования красного света и слабых низкочастотных электромагнитных полей в качестве факторов, способствующих интенсификации процесса фитоалексинообразования в ответ на заражение хлопчатника вертициллезным вилтом.

Ключевые слова: *Gossypium hirsutum* L., хлопчатник, вилт, фитоалексины, красный свет, фитохром, электромагнитные поля низкой частоты.

Как известно, повышение устойчивости хлопчатника к поражению возбудителем вертициллезного вилта во многих случаях заключается в индуцировании биосинтеза в тканях растений фитоалексинов (ФА), таких как изогемигоссипол (ИГГ) и госсипол-эквивалент (ГЭ), токсичных для возбудителя [1].

Для интенсификации иммунных реакций хлопчатника с целью повышения вилтоустойчивости применяется стимулирование фитоалексинообразования в тканях растения с помощью различных химических веществ биогенной и абиогенной природы путем замачивания семян, опрыскивания растений в различные фазы развития и т.п. [5, 14]. Однако широкое применение химических средств защиты растений сопровождается рядом отрицательных последствий: загрязнение окружающей среды, возможная адаптация гриба-возбудителя вертициллезного вилта, появление новых вирулентных рас патогена, токсическое влияние на полезную микрофлору.

На фитоалексинообразующую способность растений в ответ на заражение патогенами существенное влияние оказывают факторы окружающей среды и физиологическое состояние самого растительного организма. Свет также является индуктором фитоалексинообразования в растительной ткани. Так, ультрафиолетовое облучение (УФ-облучение)

семян и растений возбуждает защитные реакции растений [13]. В то же время создание стресса с помощью УФ-облучения (длина волн <0,4 мкм) имеет ряд недостатков, связанных с возможностью его деструктивного действия не только на патоген, но и на растение-хозяина, а также с тем, что процесс УФ-облучения трудоемок и небезвреден для организма человека.

Альтернативой УФ-облучения является красный свет (КС), который, индуцируя реакцию *цис-транс*-изомеризации хромофора фитохрома — билитриен-разомкнутого тетрапирольного цикла — активирует фитохромную систему растений и тем самым регулирует многие метаболические процессы клетки [4], в том числе и фитоалексинообразование [9]. Кроме того, показана возможность повышения устойчивости растений к различным вредным факторам, включая возбудителей болезней, с помощью кратковременного стрессирующего воздействия индукторами различной природы, т.е. закалки растений [8]. Исследования ряда авторов [2, 11, 12] показали, что к таким индукторам можно отнести и электромагнитные поля низкой частоты (ЭМП НЧ).

Учитывая эффективность и простоту использования слабых низкочастотных электромагнитных полей для обработки растений, а также их нейтральность в смысле экологического влияния, мы сравнили действие КС и ЭМП НЧ в качестве индукторов фитоалексинообразования в тканях хлопчатника, инфицированных возбудителем вертициллезного вилта.

Методика

В экспериментах использовали семена восприимчивого к вилту хлопчатника сорта С-4727 (*G. hirsutum* L.). Семена перед проращиванием в темноте для получения этиолированных проростков и перед посевом в лизиметры обрабатывали электромагнитным полем генератора электромагнитных импульсов с частотой 4 Гц и магнитной индукцией 200—500 нТл в течение 30 мин [7] или красным светом люминесцентных ламп, излучающих в области 590—660 нм, в течение 5 мин [3]. Для инфицирования растений 18—20-суточные этиолированные проростки укладывали в ванночки и путем опрыскивания обрабатывали индуктором вилтового поражения из расчета 0,05 мг/100 мл воды. Искусственное заражение растений дозированным инокулюмом расы-2 гриба *Verticillium dahliae* Kleb (2,5 млн спор/мл) проводили в фазу 5—6 настоящих листьев путем введения в зону корневой шейки с помощью стерильного капилляра. Контролем служили растения, в стебли которых с помощью капилляра вводили воду [1].

Эффективность защитных реакций хлопчатника определяли по содержанию в тканях этиолированных проростков фунгитоксичных веществ фенольной природы — фитоалексинов ИГГ и ГЭ, а также по степени поражения вегетирующих растений вилтом [1].

Стебли проростков очищали от коры, измельчали и фиксировали жидким азотом. Затем взвешивали навески по 4 г, заливали их 30 мл хлороформа и ставили в темное место на 1 сут. Затем полученный хлороформный экстракт, содержащий фитоалексины, отфильтровывали от твердых остатков, хлороформ выпаривали под вакуумом при низкой температуре (–50 °С) до сухого состояния.

Остаток растворяли в 1 мл хлороформа и наносили на пластинки Силуфола UV-254 фирмы Kavalier (Чехия). Пластинки помещали в хро-

матографические камеры и проводили однократное разделение в системе растворителей бензол—метанол (9 : 1). Бензол и метанол должны быть безводными. С примесью воды система получается мутной и непригодной для анализов. Высушенные с помощью фена хроматограммы просматривали в УФ-свете и проявляли флюороглюцином (2 % в 96 %-м этаноле).

Количественное определение фитоалексинов проводили элюированием пятен с хроматограмм смесью бензол—метанол (9 : 1) и измерением интенсивности окраски на фотоэлектроколориметре при синем светофильтре.

Вегетационные опыты проводили в 5 повторностях по 50 растений в каждой, содержание фитоалексинов определяли в 6-кратной повторности.

Результаты и обсуждение

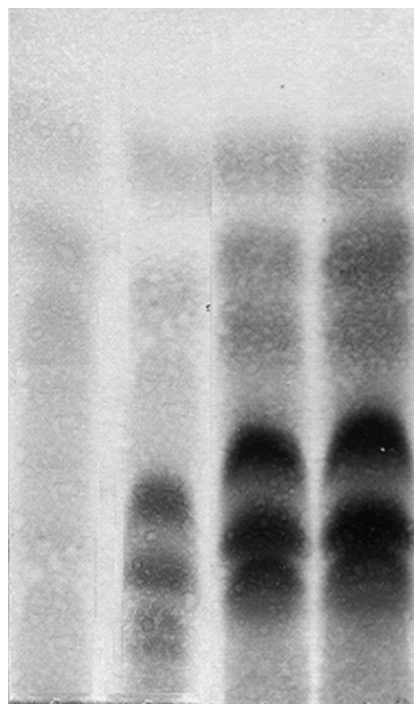
Физиолого-биохимическое изучение различных аспектов жизнедеятельности растений дает возможность использовать иммунные свойства самого организма, с помощью которых он защищается от нападения патогенов в природе. Результаты исследований показали, что КС и ЭМП НЧ действуют на проростки хлопчатника аналогично физиологически активным препаратам (индукторам), которые активируют иммунные свойства растений, проявляющиеся в продуцировании фитоалексиноподобных веществ при контакте с патогеном. Анализом хроматограмм выявлено, что обработка семян КС и ЭМП НЧ индуцирует реакцию сверхчувствительности в инфицированных патогеном тканях гипокотилей этиолированных проростков хлопчатника (рисунок). Зоны хроматограмм, в которых определяются фитоалексины ИГГ и ГЭ, окрашиваются флюороглюцином значительно интенсивнее в вариантах с проростками, выращенными из облученных индукторами семян, по сравнению с проростками из необлученных семян.

Таким образом, хроматографическая характеристика хлороформных экстрактов опытных и контрольных проростков хлопчатника качественно указывает на ФА-индуцирующую активность КС и ЭМП НЧ.

Данные, представленные в таблице, отражают влияние обработки се-

Хроматограммы количественного содержания изогемигоссиопола и госсипол-эквивалента в гипокотилеях этиолированных проростков хлопчатника сорта С-4727 через 48 ч после инфицирования грибом *V. dahliae* (инфекционная нагрузка 2,5 млн спор/мл):

К — контроль (семена перед посевом не обрабатывали, проростки не инфицировали); V.d. — семена перед посевом не обрабатывали, проростки инфицировали индуктором вилового поражения; ЭМ + V.d. — семена перед посевом обрабатывали электромагнитным полем, проростки инфицировали; КС + V.d. — семена перед посевом обрабатывали красным светом, проростки инфицировали



К V.d. ЭМ+V.d. КС+V.d.

*Влияние обработки семян электромагнитным полем низкой частоты или красным светом на содержание фитоалексинов в этиолированных проростках хлопчатника сорта С-4727 через 48 ч после инфицирования грибом *V. dahliae* (инфекционная нагрузка 2,5 млн спор/мл) и количество растений (% общего числа) с признаками вертициллезного увядания*

Вариант	ИГГ	ГЭ	Пораженные растения, %
	мкг/г сырой ткани		
Контроль	—	—	—
V.d.	19,2±2,3	25,0±2,7	28,4
ЭМ + V.d.	24,7±3,1	29,0±2,5	10,6
КС + V.d.	28,1±3,2	31,3±4,1	6,3

мян хлопчатника КС и ЭМП НЧ на количественное содержание ФА, образующихся в тканях проростков через 48 ч после инфицирования возбудителем вертициллезного вилта. Опрыскивание этиолированных проростков препаратом гриба вызывало индукцию ФА-образования, при этом как фотостимуляция, так и стрессирование семян воздействием ЭМП НЧ приводили к заметному усилению ФА-индуцирующей способности инфицированных тканей этиолированных проростков. В то же время следует отметить, что после обработки семян КС содержание ИГГ повышалось в 1,5—2 раза сильнее, чем после обработки ЭМП НЧ. Отмечена также небольшая разница в содержании ГЭ в вариантах с предобработкой семян КС и ЭМП НЧ. Выявленные различия эффективности регуляторного влияния использованных в экспериментах индукторов физической природы на интенсивность защитных реакций против возбудителя вертициллезного вилта хлопчатника связаны, по-видимому, со специфичностью действия КС на этот процесс.

Доказательством специфичности эффектов КС является разнонаправленность действия КС и дальнего красного света (ДКС) на синтез ФА: в отличие от предобработки семян КС, активирующей фитохромную систему и тем самым стимулирующей ФА-образование, обработка семян ДКС, приводящая к обратной фотоконверсии фитохрома из активной P_{dk} - в неактивную P_k -форму, не влияла на эффективность защитных реакций инфицированных растений хлопчатника по сравнению с контролем [3]. Этот факт может свидетельствовать о том, что облучение семян КС через каскад фитохромзависимых реакций способствует снятию механизма супрессии генов, ответственных за реакцию сверхчувствительности при заражении растений возбудителем вертициллезного вилта. Некоторые ученые считают [10], что механизм супрессии эффективнее функционирует в восприимчивых к вилту генотипах хлопчатника, поэтому в обычных условиях они характеризуются невысоким содержанием в тканях ФА, а после снятия этого механизма под действием активной формы фитохрома приобретают способность к существенному повышению уровня ФА-образования, как это отмечено для исследованного в наших экспериментах сорта С-4727.

Под действием неспецифических стрессирующих факторов, к которым относится и электромагнитное стрессирование, механизм образования ФА другой. В ответ на неспецифический стрессор развивается длинная и сложная цепь неспецифических ответов растения, включающая экспрессию защитных генов с последующим синтезом защитных ферментов, и т.д. [6]. Вполне вероятно, что различия в механизмах влияния КС и ЭМП НЧ на систему защитных реакций против вилтового пора-

жения хлопчатника обуславливают в конечном итоге разницу в эффективности ФА-индуцирующей способности инфицированных тканей проростков, выращенных из фотостимулированных и стрессированных электромагнитным полем семян. Различия в содержании ФА, особенно ИГГ, в опытных и контрольных вариантах хорошо коррелируют с количеством растений с признаками вилтового поражения, что является еще одним весомым доказательством эффективности применения КС и ЭМП НЧ в качестве индукторов повышения эффективности механизма ФА-образования в ответ на заражение хлопчатника вертициллезным вилтом.

1. *Авазходжаев М.Х., Зельцер С.Ш.* Физиологические факторы вилтоустойчивости хлопчатника. — Ташкент: ФАН, 1980. — 122 с.
2. *Аксенов С.И., Грунина Т.Ю., Горячев С.Н.* О механизмах стимуляции и торможения при прорастании семян пшеницы в электромагнитном поле сверхнизкой частоты // Биофизика. — 2007. — 52, № 2. — С. 332–338.
3. *Ахмеджанов И.Г., Гуссаковский Е.Е., Авазходжаев М.Х., Зельцер С.Ш.* Регуляция фитоксинообразования в тканях хлопчатника при облучении семян красным светом // Узбек. биол. журн. — 1993. — № 1. — С. 3–5.
4. *Волотовский И.Д.* Фитохром — регуляторный фоторецептор растений. — М.: Наука, 1992. — 168 с.
5. *Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф.* Общая и молекулярная фитопатология. — М.: Об-во фитопатологов, 2001. — 302 с.
6. *Малиновский В.И.* Физиология растений: Учеб. пособие. — Владивосток: Изд-во Дальневосточн. гос. ун-та, 2004. — 94 с.
7. *Тонких А.К.* Механизмы действия слабых низкочастотных электромагнитных полей на живые организмы // Узбек. биол. журн. — 2010. — Спецвыпуск. — С. 93–99.
8. *Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. — Уфа: Гилем, 2001. — 160 с.
9. *А. с. Госкомизобрет. СССР № 1782387.* / И.Г. Ахмеджанов, Е.Е. Гуссаковский, М.Х. Авазходжаев и др. Способ повышения устойчивости хлопчатника к поражению возбудителем вертициллезного вилта. — М.: 1992.
10. *Avazkhodjaev M.Kh., Zeltzer S.S., Nuritdinova H., Raviprakash G.Dani.* Phytoalexins as a factor in wilt resistance of cotton // Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. — New York—Basel—Hong Kong: Marcel Dekker Inc., 1995. — P. 129–160.
11. *Ven-Izhak M.E., Parola A.H., Kost D.* Low-frequency electromagnetic fields induce a stress effect upon higher plants, as evident by the universal stress signal, alanine // Biochem. Biophys Res. Commun. — 2003. — 302, N 2. — P. 427–434.
12. *Bilalis D.J., Katsenios N., Efthimiadou A. et al.* Magnetic field pre-sowing treatment as an organic friendly technique to promote plant growth and chemical elements accumulation in early stages of cotton // Aust. J. Crop Sci. — 2013. — 7, N 1. — P. 46–50.
13. *Haard N.F.* Stress metabolites // Post. Harvest Physiol. and Crop Preserv. Proc. NATO Adv. Study Inst. Sounion (28 Apr.—8 May 1981). — New-York—London, 1983. — P. 299–314.
14. *Stossel P., Magnolato D.* Phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* induced by chemical treatment, microbial contamination and fungal infection // Experimentia. — 1983. — 39, N 2. — P. 153–154.

Получено 08.08.2014

РЕГУЛЮВАННЯ БІОСИНТЕЗУ ФІТОАЛЕКСИНІВ В ІНФІКОВАНИХ ЗБУДНИКОМ ВЕРТИЦИЛЬОЗНОГО ВІЛТУ ТКАНИНАХ БАВОВНИКУ

І.Г. Ахмеджанов

Інститут біоорганічної хімії Академії наук Республіки Узбекистан, Ташкент

Досліджено вплив передпосівної обробки насіння бавовнику червоним світлом та електромагнітним полем низької частоти на вміст фунгітоксичних речовин фенольної природи — фітоалексинів в інфікованих збудником вертицильозного вілту проростках бавовнику. Встановлено, що фотостимуляція насіння червоним світлом індукує фітоалексиноутворення в інфікованих патогеном тканинах бавовнику в 1,5–2 рази ефективніше порівняно з

індуктором електромагнітної природи. Виявлено обернену залежність між вмістом фітоалексинів у тканинах проростків, отриманих з обробленого й необробленого індукторами насіння, та кількістю рослин з ознаками ураження вілтом, що вказує на можливість використання червоного світла і слабких низькочастотних електромагнітних полів як чинників, які сприяють інтенсифікації процесу фітоалексинутворення у відповідь на зараження бавовнику вертицильозним вілтом.

THE REGULATION OF PHYTOALEXINS BIOSYNTHESIS IN INFECTED BY
VERTICILLIUM WILT PATHOGEN COTTON TISSUES

I. G. Ahmedzhanov

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan
83 M. Ulugbek St., Tashkent, 100125, Uzbekistan

Influence of presowing treatment of seeds by red light and low-frequency electromagnetic field on maintenances of fungi toxic substances of the phenolic nature — phytoalexines in infected by *Verticillium* wilt pathogen cotton sprouts is investigated. It is established, that photostimulation of seeds by red light induces the phytoalexines formation in infected with the pathogen cotton tissues in 1,5—2 times more effectively in comparison with the inductor of electromagnetic nature. It is revealed the negative correlation between the maintenance of phytoalexins in the sprouts tissues received from treated and untreated by the inductors seeds and quantity of plants with signs of the wilt disease that specifies the possibility of use of red light and weak low-frequency electromagnetic fields as the factors promoting an intensification of process of phytoalexines formation in reply to *Verticillium* wilt infection of cotton.

Key words: *Gossypium hirsutum* L., cotton, wilt, phytoalexines, red light, phytochrome, low-frequency electromagnetic fields.