

ЖУК І.В.¹, ДМИТРИЄВ О.П.¹, ЛІСОВА Г.М.²¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: iren_zhuk@mail.ru² Інститут захисту рослин НААН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: mail_gl@mail.ru

✉ iren_zhuk@mail.ru, (097) 671-86-19

РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗИ У ФОРМУВАННІ ІНДУКОВАНОЇ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ

Індукування природної стійкості рослин за допомогою біотичних еліситорів розглядають як новий екологічно безпечний метод захисту рослин [1–3]. Проте обробка еліситорами не завжди забезпечує достатньо високий рівень індукції стійкості рослин, тому останнім часом намагаються поліпшити їх захисну дію [5]. Серед каскаду захисних реакцій у відповідь на проникнення патогену важливе місце займає механічне зміцнення клітинних стінок за рахунок лігніфікації. У біосинтезі лігніну та утворенні поперечних зшивок у клітинних стінках активну участь беруть пероксидази.

Показано, що введення біотичного Pgf-еліситору у листки ізогенних ліній *Triticum durum* Desf. сорту Prelude, що несуть алелі Sr5 і Sr5 гена стійкості до інфікування, підвищувало активність ферментів шляхів біосинтезу лігніну, у тому числі пероксидази [4]. У рослинах пероксидази, що локалізовані в апопластному просторі, поєднані іонними чи ковалентними зв'язками з полімерами клітинної стінки. У фазі виходу в трубку вміст лігніну становив 11,8% від сухої маси, у фазах колосіння та молочної стиглості, відповідно, 11,8 та 21,0% [4]. При цьому відзначена позитивна кореляція між активністю іонозв'язаних форм пероксидази та інтенсивністю лігніфікації.

Фенольні сполуки – одна з основних мішеней дії пероксидази у клітинній стінці. Роль пероксидази у метаболізмі фенольних сполук визначається її участю в утворенні пероксиду водню, необхідного для окиснення оксикоричних спиртів з утворенням фенольних радикалів та їх наступною полімеризацією в лігнін, димеризації ферулової кислоти, димеризації тирозину білкових молекул, утворенні зшивок різних полімерів – полісахаридів, білків, лігніну, суберину, що містять фенольні компоненти.

Метою роботи було дослідження ролі пероксидази у формуванні індукованої стійкості

рослин пшениці проти збудника септоріозу за допомогою комбінованого препарату, що складається з біотичного еліситору (щавелевої кислоти) та сигнальної молекули (оксиду азоту).

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були два сорти озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. – Поліська 90 та Столична. Оригінатор обох сортів – Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН України». У польових дослідах рослини пшениці обприскували 0,1 мМ водним розчином щавелевої кислоти та 0,5 мМ водним розчином донора оксиду азоту – нітропрусида натрію (НПН) у фазі виходу в трубку, на третю добу після чого проводили інокуляцію збудником септоріозу *Septoria tritici* у концентрації 10⁶ спор/мл. Як маркер індукованої стійкості визначали активність цитоплазматичної пероксидази (КФ 1.11.1.7) в листках за методом Seevers [9]. Відбір зразків проводили через добу після зараження і в подальшому 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 досліду триразова. Результати обробляли статистично з використанням програмного пакета Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Фази розвитку пшениці еволюційно збігаються з фазами розвитку гриба. Інфікування рослин відбувається шляхом потрапляння спор через продири у міжклітинний простір, коли прапорцевий листок перебуває у періоді росту. У фазі колосіння-цвітіння прапорцевий листок – актив-

но функціонуючий, зрілий орган. У цей період закінчується інкубаційний період розвитку гриба, відбувається проростання спор. У фазу молочно-воскової стиглості збудник переходить до некротрофної стадії, відбувається руйнування клітин і формування пікнід.

Внаслідок ураження септоріозом зменшується асиміляційна поверхня листка пшениці, порушується розвиток колоса, знижується кількість зерен та формуються невиповнені зернівки [10].

У сорту Поліська 90 дія нітропрусида натрію у фазі виходу в трубку підвищувала активність пероксидази у заражених рослин (рис., А). Під час окиснювального вибуху, який є однією з перших реакцій рослини на проникнення патогена, серед інших активних форм зростає і концентрація пероксиду водню. Дифузія H_2O_2 через мембрани значно швидша, ніж O_2^- . Компартменталізація клітини забезпечує обмеження локалізації H_2O_2 і формування його локальних рівнів. Універсальною відповіддю на H_2O_2 є зростання експресії антиоксидантних ферментів [6, 8]. 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 [6].

NO-сигнальна система здатна впливати на рівень пероксиду водню як прямо, так і опосередковано – через Ca^{2+} , що 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 . Отже, Ca^{2+} та NO виконують подвійну функцію у підтриманні гомеостазу H_2O_2 в клітині. Крім того, NO може взаємодіяти з пероксидазами [6, 7].

NO є ліпофільною молекулою і дифундує через мембрани. Вважають, що одним з шляхів синтезу монооксиду азоту є окисно-відновне перетворення аргініну за участю НАДФН і молекулярного кисню [7].

Слабостійкий сорт Поліська 90 у фазі виходу в трубку при зараженні септоріозом з попередньою обробкою донором оксиду азоту та щавелевою кислотою мав підвищений рівень активності фенольної пероксидази, що свідчить про низький імунітет рослин (рис., А).

У цій же фазі у більш стійкого сорту Столична щавелева кислота з оксидом азоту і у ва-

ріанті з септоріозом без обробки імуномодуляторами підвищувалась активність фенольної пероксидази, що індукувало імунітет до патогену, який проявився у зменшенні активності пероксидази за спільної дії НПН, щавелевої кислоти та септоріозу (рис., Б).

Зрілі листки слабостійкого сорту пшениці Поліська 90 у фазі колосіння-цвітіння продемонстрували відсутність попередньо сформованого імунітету, що проявилось у підвищенні активності фенольних пероксидаз, спричиненої активацією розвитку гриба (рис., А, Б). У стійкого сорту Столична висока активність фенольних пероксидаз у зрілих клітинах відзначена як за дії NO з щавелевою кислотою, так і за дії самого септоріозу та у варіанті з зараженням септоріозом після обробки донором NO, що обумовлено взаємодією сигнальної системи NO з кальцієвою сигнальною системою, яка є головною регуляторною системою клітини (рис., Б).

Фаза молочно-воскової стиглості відзначена переходом септоріозу до некротрофної стадії та зниженням активності пероксидази в обох сортів, що обумовлено процесами старіння листків і розвитком некротів.

Роль NO сигнальної системи в індукції імунітету полягала в регуляції продихових щілин і взаємодії з сигнальними системами клітини, що зменшувало проникнення і розвиток патогену. Запропонована нами в ролі еліситору щавелева кислота здатна виступати як джерело протонів, електронів та як сильний хелатор металів [8]. Біосинтез щавелевої кислоти в рослинах відбувається кількома шляхами. Вона може утворюватися при окисненні гліколату та гліоксалу за участю гліколатоксидази. Ці можливі субстрати можуть утворюватися як побічний продукт фотодихання в фотосинтетично активних тканинах. Гліколатоксидаза, фермент пероксисом, дуже поширена в цих тканинах. Оксалат також може утворюватися внаслідок дії ізоцитратліази на ізоцитрат та через окиснення оксалоацетату. І-аскорбінова кислота є субстратом для синтезу оксалату у багатьох видів рослин. Однак гліколатний шлях є найбільш імовірним, оскільки він спільний у тканинах з C_3 -типом фотосинтезу.

Показано, що активність пероксидази у нестійкого сорту Поліська 90 через добу після зараження була найвищою в інфікованих рослин, які попередньо обробили донором оксиду азоту та щавелевою кислотою (рис., А). Пероксидаза бере участь у кількох захисних механізмах рослин, у тому числі й у лігніфікації, зв'язуванні білків

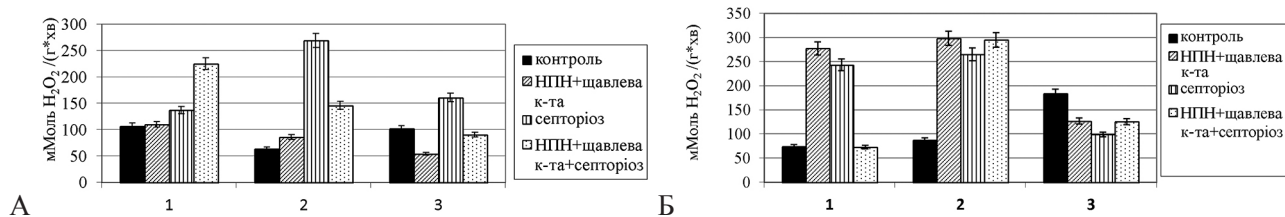


Рис. Вплив обробки донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію (НПН) та щавелевою кислотою на активність пероксидази в листках озимої пшениці сорту Поліська 90 (А) та Столична (Б) за умов ураження збудником септоріозу (1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – фаза молочної стиглості зерна)

клітинної стінки, в процесах заживлення поранень та генерації активних форм кисню. Відомо, що грибні патогени здатні специфічно індукувати синтез нових ізоформ пероксидаз у тканинах рослини-господаря. Різке зростання активності пероксидази в інфікованих рослин пшениці сорту Поліська у фазу колосіння-цвітіння може бути обумовлене цим. У подальшому протягом фази молочної стиглості зерна показано, що сумісна обробка нітропрусидом натрію та щавелевою кислотою знижувала активність пероксидази в оброблених рослин порівняно з необробленими, за умов ураження збудником *S. tritici*, до рівня контролю. Оскільки пероксидаза є субстратіндуцибельним ферментом, це може бути спричинено зменшенням ендогенного пулу пероксиду водню і, відповідно, рівня окиснювального стресу.

У більш стійкого сорту Столична у фазах виходу в трубку та колосіння-цвітіння відзначено високий рівень активності пероксидази в інфікованих рослин без обробки, у той час як у оброблених він залишався на рівні контролю. Однак вже у фазі колосіння-цвітіння після закінчення інкубаційного періоду збудника він різко зріс, що може бути обумовлено інтенсифікацією процесів росту і розвитку, в яких задіяні активні форми кисню та пероксидази, зокрема побудова клітинних стінок для ізоляції гіф гриба від поширення по рослині.

Показано, що дія еліситору знижувала ступінь ураження листків пшениці збудником септоріозу в обох сортів на 10–15% в середньому (від 5 до 6 балів за шкалою Саарі та Прескотта). У більш стійкого до септоріозу сорту Столична відзначено менші кількості та розміри хлоротичних плям.

У контрольному варіанті стійкий сорт Столична виявився більш продуктивним порівняно зі слабостійким Поліська 90. Зараження септоріозом зменшувало продуктивність слабостійкого сорту на 24%, а стійкого – на 14%. Однак індукований щавелевою кислотою імунітет підвищував стійкість до септоріозу у Столичної на 25%, Поліської 90 – на 50%.

Висновки

Показано, що у зрілих листках сорту пшениці Поліська 90 відсутність попередньо сформованого імунітету й активація розвитку гриба спричиняли підвищення активності фенольної пероксидази, що обумовлено значним зростанням рівня АФК (активні форми кисню) в інфікованих рослин. У сорту Столична висока активність фенольної пероксидази в зрілих листках відзначена при комбінованій обробці щавелевою кислотою з NO й у відповідь на зараження збудником *Septoria tritici* оброблених донором оксиду азоту рослин, що обумовлено, очевидно, взаємодією NO-синтазної сигнальної системи з кальцієвою сигнальною системою. Встановлено, що з двох сортів озимої пшениці сорт Столична виявився більш стійким до септоріозу, ніж сорт Поліська 90 за ступенем ураження, біохімічними маркерами стійкості та морфометричними параметрами. Показано, що комбінована обробка щавелевою кислотою та донором сигнальної молекули сприяла реалізації потенційної продуктивності в обох сортів пшениці за умов ураження септоріозом. Так, індукування щавелевою кислотою природного імунітету рослин підвищувало їх стійкість до ураження *S. tritici* у сорту Столична на 25%, у сорту Поліська 90 – на 50%.

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. Дмитрієв 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.
3. Дмитрієв О.П., Ковбасенко Р.В., Авдеева Л.В., Лапа С.В., Ковбасенко В.М. Сигнальні системи рослин та формування стійкості проти біотичного стресу. – К.: Фенікс, 2015. – 192 с.
4. Овруцька І.І. Уявлення про лігніфікацію клітинних стінок // Укр. ботан. журн. – 2007. – 64, № 5. – С. 720–729.
5. Тютєрев С.Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам // Вестник защиты растений. – 2015. – 1, № 83. – С. 3–13.
6. Van Breusegem F., Vranova E., Dat J.F., Inze D. The role of active oxygen species in plant signal transduction // PlantScience. – 2001. – 161. – P. 405–414.
7. He X., Qu B., Li W., Zhao X., Teng W., Ma W., Ren Y., Li B., Li Z., Tong Yi. The nitrate-inducible NAC transcription factor TaNAC2-5A controls nitrate response and increases wheat yield // PlantPhysiology. – 2015. – 169. – P. 1991–2005.
8. Mittler R. Oxidativestress, antioxidantsandstresstolerance. TRENDS in Plant Science. – 2002. – 7, N 9. – P. 405–410.
9. Seevers P.M., Daly J.M., Catedral F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease // PlantPhysiol. – 1971. – 48, N 3. – P. 353–360.
10. 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.¹, DMITRIEV A.P.¹, LYSOVA G.M.²

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. Of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: iren_zhuk@mail.ru

² Institute of Plant Protection of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: mail_gl@mail.ru

THE ROLE OF PEROXIDASE IN FORMATION OF NONSPECIFIC WHEAT PLANTS TOLERANCE VIA IMMUNOMODULATORS

Aim. 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 role of peroxidase under combined action of oxalic acid and NO in elicitation of wheat systemic defense responses against *Septoria tritici* blotch agent in field trials. **Methods.** The peroxidase activity was measured in leaves of elicitor-treated winter wheat plants (cv. Poliska 90 and Stolychna) after *S. tritici* blotch inoculation during ontogenesis. The morphometric parameters, extent of disease development and yield structure were analyzed. **Results.** The data obtained suggest that oxalic acid induced in both wheat cultivars (Stolychna and Poliska 90) defense responses against *S. tritici* blotch agent. Initiation of defense responses in elicitor-treated plants occurred shortly. The effect of oxalic acid treatment increased the hydrogen peroxide content. The effect of oxalic acid also increased the grain quantity and plant height. **Conclusions.** Elucidation of biochemical nature of the defense responses elicitation revealed increased peroxidase activity for lignin synthesis and mechanical strengthening of the plant cell walls.

Keywords: peroxidase, oxalic acid, NO, *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici*.