

РОЛЬ БІОТИЧНИХ ЕЛІСИТОРІВ У ЗАХИСТІ ПШЕНИЦІ ВІД ФІТОПАТОГЕННИХ ГРИБІВ

І.В. Жук¹, О.П. Дмитрієв¹, Г.М. Лісова², Л.О. Кучерова²

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

e-mail: ivzhukvi@gmail.com

²Інститут захисту рослин НААН, Україна

e-mail: mail_gl@ukr.net

Актуальна проблема сучасного рослинництва – захист рослин від фітопатогенів, ураження якими є причиною втрати щорічно від 20 до 35% врожаю. Традиційні засоби боротьби – селекція нових сортів на стійкість та застосування пестицидів – не усувають загрози накопичення резистентних форм. Одним з найбільш перспективних альтернативних методів є індукування природної стійкості рослин. Сучасна концепція імунітету рослин стверджує, що захист рослинного організму від впливу патогену визначається функціонуванням багаторівневої системи за участю механізмів специфічного і неспецифічного імунітету. Перший рівень вродженого імунітету (РПІ) визначає неспецифічну (базову) стійкість, тоді як другий рівень (ЕПІ) – специфічну стійкість, що призводить до розвитку реакції надчутливості (hypersensitive reaction, HR). Родина мембранних рецепторних кіназ WAK (wall associated kinases) взаємодіє з клітинною стінкою рослин, визначає цілісність її олігогалактуронатів, сприймає DAMP та здатна активувати сигнальні каскади та транскрипцію генів стійкості. Трансдукція сигналу призводить до зміни концентрації цитоплазматичного кальцію, продукції активних форм кисню (АФК) та азоту (NO) – сигнальних молекул, що беруть участь у розвитку системної стійкості.

Тому метою нашої роботи було дослідження індукції біотичним еліситором щавлевою кислотою, що пов'язана з ферментами, які деполімеризують клітинну стінку, та донором сигнальної молекули NO системної стійкості *Triticum aestivum* L. проти збудника *Septoria tritici*.

Об'єктом досліджень були сорти озимої м'якої пшениці Поліська 90 та Столична селекції Національного наукового центру «Інститут землеробства НААН». У польовому досліді рослини пшениці обприскували 0,1 мМ водним розчином щавлевої кислоти та 0,5 мМ водним розчином донору оксиду азоту – нітропрусида натрію (НПН) у фазі виходу в трубку, після чого на третю добу проводили інокуляцію збудником септоріозу в концентрації 10^6 спор/мл. Як маркер індукованої стійкості визначали активність цитоплазматичної пероксидази (КФ 1.11.1.7) в листках за методом Seevers та вміст ендogenous пероксиду водню за реакцією з сульфатом титану. 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 фазі молочно-воскової стиглості зерна, використовуючи 9-бальну шкалу Саарі та Прескотта (1988). 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 програмного пакету Microsoft Excel.

Фази розвитку пшениці еволюційно співпадають з фазами розвитку гриба. У фазі виходу в трубку прапорцевий листок перебуває у періоді росту. У цей час відбувається інфікування рослин, спори через продихи потрапляють у міжклітинний простір. У фазі колосіння-цвітіння листок є активно функціонуючим, зрілим органом, і в цей період закінчується інкубаційний період розвитку гриба, відбувається проростання спор.

У фазі молочно-воскової стиглості збудник переходить до некротрофної стадії, відбувається руйнування клітин і формування пікнід. Фітопатогенні гриби для надходження ефекторів використовують транспортні системи рослинної клітини. Розвиток реакції

надчутливості ефективний лише у захисті рослин від біотрофних фітопатогенів. Для некротрофних же необхідна швидка загибель рослинного організму, що забезпечує завершення їхнього клітинного циклу та подальше поширення в рослині-хазяїні. Ймовірно тому некротрофні патогени використовують розвиток HR-реакції на свою користь. Іншою важливою функцією реакції HR є індукція «сигналів тривоги» та їх поширення по плазмодесма та ксилемі по всій рослині. Унаслідок ураження септоріозом зменшується асиміляційна поверхня листка пшениці, порушується розвиток колоса, знижується кількість зерен та формуються невиповнені зернівки.

У сорту Поліська 90 у фазі виходу в трубку підвищувалась активність фенольної пероксидази при зараженні септоріозом з попередньою обробкою донором оксиду та щавлевою кислотою, що свідчить про низький імунітет рослин.

Під час окиснювального вибуху, який є однією з перших реакцій рослини на проникнення патогена, серед інших активних форм зростає і концентрація пероксиду водню. NO-сигнальна система здатна впливати на рівень пероксиду водню як напряму, так і опосередковано, через Ca^{2+} , який активує локалізовану в мембрані НАДФ Н-оксидазу. Збільшення концентрації кальцію спричиняє активацію його сенсору кальмодуліну і забезпечує передачу сигналу до каталази, яка регулює ендogenousний 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 як гемвмісними ферментами.

У цій же фазі у сорту Столична щавлева кислота з оксидом азоту і окремо септоріоз підвищували активність фенольної пероксидази, що індукувало імунітет до патогену, який проявився у зменшенні активності пероксидази за спільної дії НПН, щавлевої кислоти та септоріозу.

У зрілих листках слабостійкого сорту пшениці Поліська 90 у фазі колосіння-цвітіння відсутність попередньо сформованого імунітету і активація розвитку гриба спричиняли підвищення активності фенольних пероксидаз, що обумовлюється значним підвищенням рівня АФК за дії патогену. У стійкого сорту Столична висока активність фенольних пероксидаз у зрілих клітинах відзначена як за дії NO з щавлевою кислотою, так і за дії самого септоріозу, зараження септоріозом після дії NO, що обумовлено взаємодією сигнальної системи NO з кальцієвою сигнальною системою, яка є головною регуляторною системою клітини.

У сорту Столична за умов ураження збудником септоріозу дещо знижувався вміст пероксиду водню за дії НПН та щавлевої кислоти. У фазі виходу в трубку ці значення коливались на рівні контрольного варіанту, хоча у фазі колосіння-цвітіння зростали за умов сумісної дії елісатору та донору оксиду азоту. У фазі молочної стиглості зерна, після завершення формування генеративних та вегетативних органів, вміст ендogenousного пероксиду водню стабілізувався. Його накопичення в клітинах може призводити до зміни в балансі між сульфгідрильними та дисульфідними групами білків, таких, як протеїнази і фактори регуляції транскрипції, та до передачі стресового сигналу в геном. Як відомо, мембрани можуть обмежувати транспорт H_2O_2 та генерувати градієнти і сигналінг з цитоплазми до внутрішніх компартментів. Регулюється транспорт H_2O_2 аквапоринами. У фазі молочно-воскової стиглості в період некротрофної стадії септоріозу активність пероксидази у обох сортів знижувалась, що обумовлено процесами старіння листкового апарату рослин і розвитком некрозів. Роль NO-сигнальної системи в індукції імунітету полягала в регуляції продигових щілин і взаємодії з сигнальними системами клітини, що зменшувало проникнення і розвиток патогену.

У зрілих листках слабостійкого сорту пшениці Поліська 90 у фазі колосіння-цвітіння відсутність попередньо сформованого імунітету і активація розвитку гриба спричиняла підвищення активності фенольних пероксидаз, яка обумовлюється значним підвищенням рівня АФК за дії патогену. У стійкого сорту Столична висока активність фенольних пероксидаз у зрілих клітинах відзначена як за дії NO з щавлевою кислотою, так і за дії самого септоріозу, зараження септоріозом після дії NO, що обумовлено взаємодією

сигнальної системи NO з кальцієвою сигнальною системою, яка є головною регуляторною системою клітини. Однак за дії елісатору та щавлевої кислоти у інфікованих рослин сорту Поліська 90 відбувалось зниження вмісту пероксиду водню практично до рівня контролю у фазі молочно-воскової стиглості зерна. При цьому у фазі колосіння-цвітіння, за умов закінчення інкубаційного періоду патогенів та інтенсивного синтезу клітинних стінок у рослин, формування вегетативних та генеративних органів, відзначено найвищі значення вмісту пероксиду водню.

У фазі молочно-воскової стиглості в період некротрофної стадії септоріозу активність пероксидази у обох сортів знижувалась, що обумовлено процесами старіння листового апарату рослин і розвитком некрозів.

Пероксидаза бере участь у кількох захисних механізмах рослин, у тому числі й у лігніфікації, зв'язуванні білків клітинної стінки, у процесах заживлення поранень та генерації активних форм кисню. Відомо, що грибні патогени здатні специфічно індукувати синтез нових ізоформ пероксидаз у тканинах рослини-господаря. Цим може бути обумовлене різке зростання активності пероксидази у інфікованих рослин пшениці сорту Поліська 90 у фазі колосіння-цвітіння. В подальшому, протягом фази молочної стиглості зерна, показано, що сумісна обробка нітропрусидом натрію та щавлевою кислотою знижувала активність пероксидази у оброблених рослин порівняно з необробленими за умов ураження збудником *S. tritici* до рівня контролю.

Показано, що дія елісатору знижувала ступінь ураження листків пшениці збудником септоріозу в обох сортів у середньому на 10–15% (від 5 до 6 балів за шкалою Саарі та Прескотта).

Встановлено, що з двох сортів Столична була більш стійкою проти септоріозу, спостерігалась менша кількість та розмір хлоротичних плям. За морфометричними даними, обробка щавлевою кислотою та донором сигнальної молекули оксиду азоту сприяла реалізації потенційної продуктивності пшениці за умов ураження септоріозом.

Зараження септоріозом зменшувало продуктивність слабостійкого сорту на 24%, а стійкого – на 14%. Однак індукований щавлевою кислотою імунітет підвищував стійкість до септоріозу у Столичної на 25%, у Поліської 90 – на 50%.

Таким чином, у мілімолярних концентраціях оксид азоту здатний бути синергістом пероксиду водню, а також регулювати рівень пероксиду водню шляхом впливу на фермент пероксидазу та через кальцієву сигнальну систему. Щавлева кислота, як і оксид азоту, впливає на АБК-залежний процес закриття продихів, що перешкоджає проникненню спор.

Показано, 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 і попереджений застосуванням біотичного елісатору.

Відзначено стимулювання ростових процесів у оброблених рослин, сприяння реалізації потенційної продуктивності. Можливе поєднання обробки елісатором з іншими речовинами – донорами сигнальних молекул, стимуляторами росту та ін.

Обробка елісатором є високоефективною і має вищий рівень екологічної безпеки за рахунок активації природних механізмів стійкості рослин, системність і тривалість захисного впливу, низькі концентрації діючих речовин, участь у прояві стійкості багатьох захисних систем, що знижує ймовірність накопичення резистентних форм фітопатогенів, комплексний захисний ефект проти патогенів різної природи, відсутність токсичного впливу на організми, що не є мішенями.