

ДОСЛІДЖЕННЯ «ПРАЙМІНГУ» НАКОПИЧЕННЯ КАЛОЗИ У *ALLIUM SERA* ПРИ ОБРОБЦІ БІОТИЧНИМИ ІНДУКТОРАМИ



Досліджено вплив попередньої обробки індукторами стійкості цибулі на рівень синтезу калози. Методом спектрофлуориметрії показано, що обробка лусок цибулі саліциловою та гексановою кислотами призводить до праймування реакції відкладання калози, тобто зміцнення механічного бар'єра на шляху інфекції.

© С.О. ПОЛЯКОВСЬКИЙ, О.П. ДМИТРІЄВ, 2011

Вступ. Аналіз результатів досліджень останніх років вказує, що всі рослини володіють певним генетичним потенціалом стійкості до хвороб. В той же час більшість патогенів «знаходять ключ» до надійних механізмів захисту. Крім цього, результат взаємодії в системі «патоген – рослина» залежить не тільки від фізіологічного стану кожного із партнерів або умов навколишнього середовища в період зараження та розвитку інфекції, а також від швидкості вмикання та величини експресії генетичного потенціалу стійкості [1, 2]. Іншими словами, або рослина встигне достатньо швидко, «в необхідному місці, в необхідний час», в необхідній концентрації розгорнути заходи пригнічення патогена, або він зуміє випередити рослину-господаря, використавши неспецифічні та специфічні супресори захисних реакцій.

Досить перспективним є використання хімічних сполук як індукторів системної стійкості, які у певних концентраціях не активують безпосередньо захисні реакції, але «праймують» рослину до наступних стресів. Праймування, як відомо, це такий фізіологічний стан рослини, в якому вона здатна швидше і якісніше відповідати на дію стресора [8]. Так, нещодавно було продемонстровано, що праймування захисних реакцій у рослин призводить до збільшення стійкості з мінімальним впливом на ріст і врожайність [3]. Тому дослідження молекулярних механізмів праймування може стати основою для створення ефективних і безпечних методів захисту рослин від біотичних та абіотичних стресорів.

Калоза є лінійним 1,3- β -глюканом, який хімічно відрізняється від целюлози – головного компоненту клітинних стінок рослин. При проникненні несумісних патогенів у рослину клітину на внутрішньому боці клітинної стінки утворюється потовщення – папіла, яка перешкоджає проникненню гіфи гриба [4]. Швидко утворення та локалізоване відкладання калози важливі для функціонування «першої лінії оборони рослини» [4].

Відомо, що саліцилова кислота (СК) відіграє важливу роль у формуванні захисних реакцій у відповідь на дію біотичних стресорів. Рівень СК в рослинних тканинах збільшується після інфікування патогеном, а екзогенне застосування СК призводить до підвищеної стійкості до широкого кола патогенів [5]. Генетичні дослідження показали, що СК необхідна для

швидкої активації захисних реакцій, які обумовлені декількома генами стійкості, для індукції локального захисту проти вірулентних патогенів і формування системної індукованої стійкості (СІС). СІС визначають як стан підвищеного захисту, який поширюється по всій рослині після первинного інфікування некротрофними патогенами.

Використання хімічних сполук як індукторів стійкості у рослин є цікавим та перспективним напрямком. Але скринінг нових сполук для контролю хвороб, які були б використані в польових умовах та в умовах закритого ґрунту, потребують дотримання наступних правил:

- 1) бути не токсичними для патогенів, рослин і тварин;
- 2) не мати негативного ефекту на ріст, розвиток і продуктивність рослин;
- 3) індукувати тривалу стійкість широкого спектра;
- 4) мати низькі ефективні концентрації;
- 5) мати низьку вартість.

Мета роботи полягала у з'ясуванні впливу двох біотичних сполук — саліцилової та гексанової кислот на індукування стійкості *A. сера* до некротрофних грибів *Botrytis* spp. та дослідженні можливих механізмів дії цих індукторів.

Матеріали та методи. *Рослинний та грибний матеріали.* Для проведення експериментів використовували цибулини трьох різних сортів: сорт Сквирський, червоний Ялтинський та солодкий сорт Стерлінг. Цибулини зберігали при 4 °С в темряві і для експериментів витримували 12 год при кімнатній температурі. Ізоляти *B. allii* (15972) та *B. cinerea* (15702) були отримані з колекції Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Обробка рослинного матеріалу та інокуляція патогенами. Для експериментів використовували м'ясисті луски цибулин, які поміщали на фільтровальний папір в пластикові коробки. Саліцилову (СК) та гексанову (ГК) кислоти розчиняли у воді і вносили по 1 мл (1 та 0,6 мМ відповідно) розчину в луски, як у чашечки. Оптимальні концентрації індукторів були встановлені в попередніх дослідках (дані не наведено). Через 24 год луски промивали стерильною дистильованою водою та поміщали в коробки абаксальною стороною вниз для іно-

куляту. Інокулювали рослинний матеріал шляхом нанесення 6 мкл суспензії спор (10^4 спор/мл — *B. allii*; $5 \cdot 10^4$ спор/мл — *B. cinerea*).

Кількісне визначення калози проводили за модифікованим методом Каусса [4]. З лусок вирізали диски масою 1 г. Для видалення аутофлуоресцентного матеріалу клітини витримували 1 год в 70%-ному етанолі, після чого диски тричі промивали стерильною дистильованою водою та гомогенізували у фарфоровій ступці з 3 мл 1 М NaOH. Одержаний гомогенат витримували 15 хв на водяній бані при 80 °С для розчинення калози, після чого осаджували центрифугуванням (380 g, 5 хв). Вміст білків у супернатанті визначали за методом Лоурі [6]. Для визначення вмісту калози до 200 мкл супернатанту додавали 400 мкл 0,01%-ного водного розчину анілінового блакитного. Розчин набував інтенсивного фіолетово-червоного забарвлення. Після цього до розчину додавали 210 мкл 1 н HCl та 590 мкл 1 М буфера гліцин/NaOH (рН 9,5). Забарвлення розчину змінювалось на яскраво-блакитне. Суміш струшували та поміщали на водяну баню. Витримували 20 хв при 50 °С, а після цього ще 30 хв при кімнатній температурі. Флуоресценцію розчину вимірювали на спектрофлуориметрі СДЛ-2 («ЛОМО», Росія). Довжина хвилі збудження (λ_{ex}) становила 397 нм, а довжина хвилі вимірів (λ_{em}) — 490 нм. Для побудови калібрувальної кривої використовували свіжий розчин β -1,3-глюкану — пахімана в 1 М розчині NaOH у діапазоні концентрацій 0,2–8 мкг/мл.

Результати досліджень та їх обговорення. Обробка лусок цибулі самими індукторами не призводила до стимуляції накопичення калози (дані не наведено). Однак у випадку інфікування оброблених індукторами лусок як *B. cinerea*, так і *B. allii* спостерігали стимуляцію накопичення калози. Інтенсивне її накопичення фіксували вже через 24–48 год після інокуляції патогенами в передоброблених зразках (рис. 1 і 2). В контролі, коли луски обробляли водою, накопичення калози починалось з 48-ї години інфікування та досягало максимуму на 72-й годині. Таким чином, обробка лусок цибулі СК в концентрації 1 мМ призводила до праймування реакції калозоутворення, раннього та більш інтенсивного на-

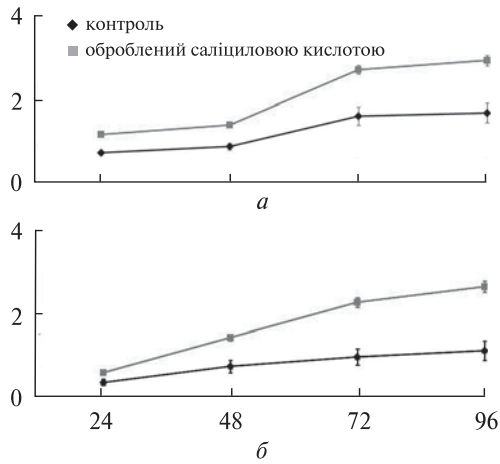


Рис. 1. Накопичення калози в клітинах цибулі сорту Сквирський, передобробленого СК, у відповідь на зараження грибом *B. cinerea* (а) та *B. allii* (б): по вертикалі – вміст калози, мг-екв; по горизонталі – експозиція, год

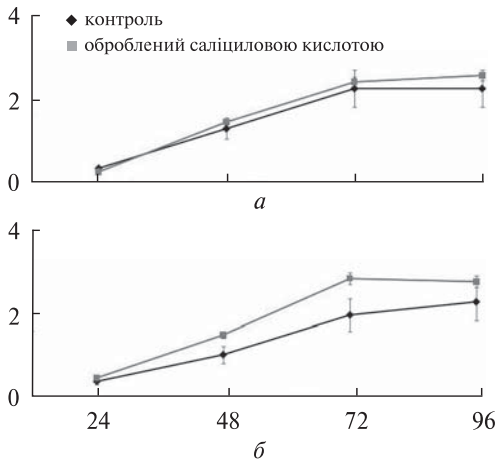


Рис. 2. Рівень калозоутворення в клітинах цибулі сорту Ялтінський, передобробленого СК, у відповідь на зараження грибом *B. cinerea* (а) та *B. allii* (б): по вертикалі – вміст калози, мг-екв; по горизонталі – експозиція, год

копичення калози в місцях інвазії некротрофних патогенів.

Очевидно, що за рахунок зміцнення механічного бар'єра шляхом більш швидкого та інтенсивного накопичення калози рослина не давала можливості гіфам гриба проникати в клітини та пошкоджувати їх.

На протизагу від обробки лусок цибулі сорту Стерлінг β -амінобутириловою кислотою, яка не викликала ефекту праймування [17], обробка лусок СК викликала хоча і незначне,

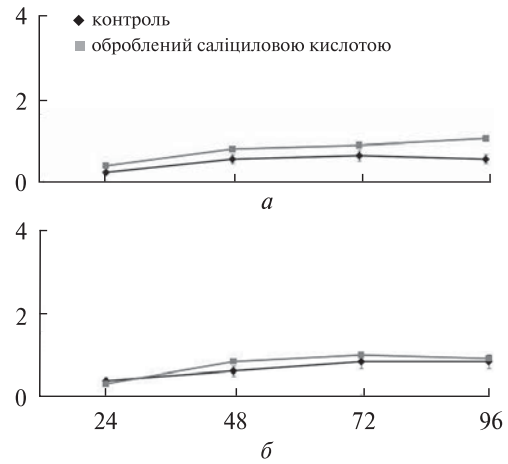


Рис. 3. Накопичення калози в клітинах цибулі сорту Стерлінг, передобробленого СК, у відповідь на зараження грибом *B. cinerea* (а) та *B. allii* (б): по вертикалі – вміст калози, мг-екв; по горизонталі – експозиція, год

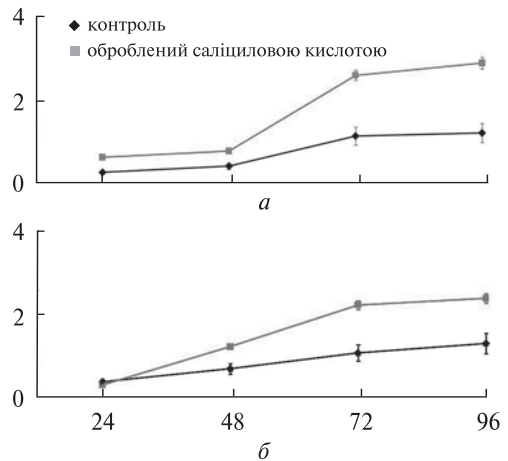


Рис. 4. Накопичення калози в клітинах цибулі сорту Сквирський, передобробленого ГК, у відповідь на зараження грибом *B. cinerea* (а) та *B. allii* (б): по вертикалі – вміст калози, мг-екв; по горизонталі – експозиція, год

але певне накопичення калози (рис. 3). Однак цієї кількості було недостатньо для забезпечення захисту.

Нездатність забезпечувати високий рівень захисту проти збудників шийкової та сірої гнилі цибулі сорту Стерлінг пов'язана, на наш погляд, з особливостями генотипу цього сорту.

Обробка лусок самою ГК, як було зазначено вище, не призводила до накопичення калози. Однак вже через 24 год після інфікування некротрофними грибами кількість накопиченої

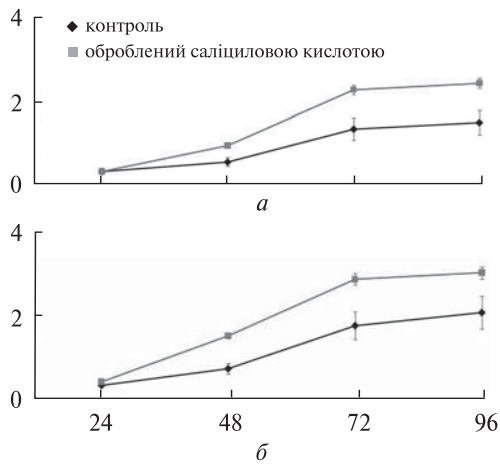


Рис. 5. Калозоутворення в клітинах цибулі сорту Ялтинський, передобробленого ГК, у відповідь на зараження грибом *B. cinerea* (а) та *B. allii* (б): по вертикалі – вміст калози, мг-екв; по горизонталі – експозиція, год

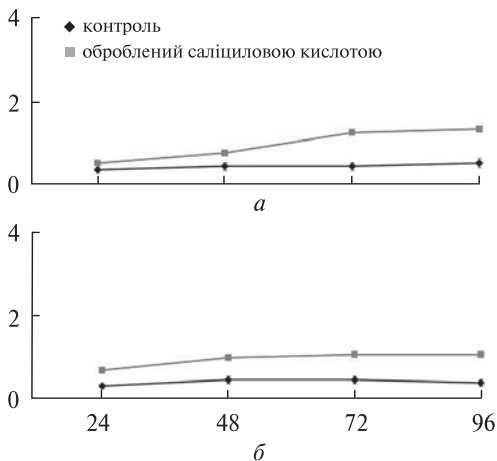


Рис. 6. Накопичення калози в клітинах цибулі сорту Стерлінг, передобробленого ГК, у відповідь на зараження грибом *B. cinerea* (а) та *B. allii* (б): по вертикалі – вміст калози, мг-екв; по горизонталі – експозиція, год

калози була вищою порівняно з контролем більш ніж в два рази (рис. 4, а)

У випадку інфікування специфічним некротрофом *B. allii* накопичення калози в лусках цибулі сорту Свирський починалось через 24 год після інфікування і досягало свого максимуму на 72-й годині (рис. 4, б).

Обробка ГК лусок цибулі сорту Ялтинський також викликала інтенсивне накопичення калози (рис. 5). ГК була здатна ефективно захи-

щати цибулю цього сорту від патогенів *Botrytis* spp, праймуючи реакцію калозоутворення.

Так само, як і у випадку з обробкою СК лусок цибулі сорту Стерлінг, ГК викликала порівняно невелику кількість накопичення калози (рис. 6). Хоча через 72 год після інфікування рівень калози і перевищував аналогічний показник у контролі, але це не супроводжувалось підвищенням рівня стійкості цього сорту до некротрофних грибів.

Одним з механізмів, які забезпечують індуквану стійкість у випадку передобробки СК та ГК в мілімолярних концентраціях у *A. cepa*, може бути праймування реакції калозоутворення. Такий механізм був повністю відсутній у випадку обробки індукторами сорту Стерлінг. Тому детальне дослідження праймування у сортів цибулі і особливо у сорту Стерлінг допоможе запропонувати модель механізму індукваної стійкості у *A. cepa*.

Висновки. Показано, що СК та ГК в низьких концентраціях (до 1 та 0,6 мМ відповідно) здатні ефективно індукувати праймування відкладання калози у рослин *Allium cepa* при обробці фітопатогенними грибами. Передобробка індукторами лусок Сквирського та Ялтинського сортів призводила до значного збільшення кількості калози і, як наслідок, підвищення стійкості до *B. allii* та *B. cinerea*. Дослідження накопичення калози свідчать про те, що механізм праймування у *A. cepa* може бути заснований на реакції калозоутворення у відповідь на інфікування некротрофними патогенами. Більш швидке та інтенсивне накопичення калози, яка є основним механічним бар'єром на шляху проникнення патогена, призводить до підвищення хворобостійкості *A. cepa*. Однак використані нами індуктори не здатні праймувати накопичення калози у сорту Стерлінг та, як результат, не можуть індукувати стійкість цього сорту до грибів роду *Botrytis*. Таким чином, використання індукторів, зокрема СК та ГК, в сільськогосподарській практиці були б цікаві з точки зору підвищення природної стійкості до стресів. Більш детальні дослідження механізмів праймування захисних реакцій за допомогою передобробки індукторами могли б запропонувати нові, альтернативні методи захисту рослин.

S.A. Polykovskiy, A.P. Dmitriev
STUDI «PRIMING» CALLOSE ACCUMULATION
IN *ALLIUM CEPA* WHEN
PROCESSING BIOTIC INDUCERS

Effect of salicylic and caproic acids as an inducers of plant resistance was studied using three onion cultivars differed in resistance to *Botrytis* spp. Salicylic and caproic acids were shown to prime callose accumulation in *Allium cepa* varieties resistant to *B. allii* and *B. cinerea*. The results obtained suggest that protection of onion against necrotrophs involves the priming of callose accumulation which is important mechanical barrier against invading pathogens.

С.А. Поляковский, А.П. Дмитриев
ИССЛЕДОВАНИЕ «ПРАЙМИНГА»
НАКОПЛЕНИЯ КАЛЛОЗЫ У *ALLIUM CEPA*
ПРИ ОБРАБОТКЕ БИОТИЧЕСКИМИ
ИНДУКТОРАМИ

Исследовано воздействие предварительной обработки индукторами устойчивости (салициловая и гексановая кислоты) клеток лука трех сортов на уровень синтеза каллозы. Показана способность низких концентраций этих индукторов повышать устойчивость лука к патогенным инфекциям. Методом спектрофлуориметрии показано, что обработка чешуй лука салициловой и гексановой кислотами приводит к праймированию реакции отложения каллозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дмитриев А.П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. — К.: Наук. думка, 2000. — 208 с.
2. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 298 с.
3. Yigal R., Cohen E. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens // *Plant Disease*. — **86**, № 5. — P 448–452.
4. Kauss H. Callose synthesis // *Membranes: Specialized Functions in Plants*. — Guildford, UK: Bios Sc. Publ., 1996. — P 77–92.
5. Поляковский С.О., Емельянов В.И., Дмитриев О.П. Кількісне визначення накопичення каллози у трьох сортів *Allium cepa*, оброблених індукторами стійкості // *Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку* : Тез. докл. Міжнар. конф. — К., 2009. — Т. 2. — С. 361–364.
6. Скоупс Р. Методы очистки белков : Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — 260 с.

7. Aist J. Papillae and related wound plugs of plant cells // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1976. — **14**. — P. 145–165.
8. Conrath U., Beckers G., Flors V., Garcia-Agustin P., Jakob G., Mauch F., Newman M., Pieterse C., Poinssot B., Pozo M., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B. Priming : Getting ready for battle // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 2006. — **19**. — P. 1062–1071.
9. Ton J., Jakob G., Toquin V., Iavicoli A., Flors V., Maeder M., Mettraux J.-P., Mauch-Mani B. Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming pathways in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. — 2005. — **17**. — P. 987–999.
10. Ton J., Mauch-Mani B. β -aminobutyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on BABA-dependent priming for callose // *Plant J.* — 2004. — **38**. — P. 119–130.
11. Van Hulten M., Pelsler M., Van Loon L., Pieterse C., Ton J. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2006. — **103**. — P. 5602–5607.
12. Koch E., Slusarenko A. *Arabidopsis* is susceptible to infection by downy mildew fungus // *Plant Cell*. — 1990. — **2**. — P. 437–445.
13. Hamiduzzaman M., Jakob G., Barnavon L., Neuhaus J.-M., Mauch-Mani B. β -aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevines acts through potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 2005. — **18**. — P. 819–829.
14. Zimmerli L., Jakob G., Mettraux J.-P., Mauch-Mani B. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2000. — **97**. — P. 12920–12925.
15. An Q., Huckelhoven R., Kogel K., van Bel A. Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defense response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus // *Cell. Microbiol.* — 2006. — **8**. — P. 1009–1019.
16. Ryals J., Neuenschwander U., Willits M., Molina A., Steiner H., Hunt M. Systemic acquired resistance // *Plant Cell*. — 1996. — **8**. — P. 1809–1819.
17. Емельянов В.И., Кравчук Ж.Н., Поляковский С.О., Дмитриев А.П. Отложение каллозы при обработке клеток томатов биотическими элиситорами (*Lycopersicon esculentum* L.) // *Цитология и генетика*. — 2008. — **42**, № 2. — С. 21–28.

Надійшла 25.10.10