

УДК 581.1:581.2+633.1:632+579.6

**ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА МОРФОГЕНЕЗ ТА
АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ ЛИСТКІВ РОСЛИН М'ЯКОЇ
ПШЕНИЦІ, ІНФІКОВАНИХ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR.
GRANULUM ШТАМ 118**

В.П. ПАТИКА, Г.Б. ГУЛЯЄВА, І.П. ТОКОВЕНКО, К.С. КОРОБКОВА

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України
Д03680, Київ МСП, вул. Академіка Заболотного, 154*

У досліджах на 32-добових інфікованих *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118 рослинах м'якої пшениці сорту Зимоярка продемонстровано стимулювальний ефект ІОК за масою. Інокуляція фітопатогенною ахолеплазмою пригнічувала пероксидазну активність, у той час як каталазна істотно зростала. Встановлено стимулювальний ефект обробки кінетином на пероксидазну активність листків пшениці, ураженої *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., пшениця, *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* штам 118, ахолеплазма, фітомікоплазмоз, кінетин, ІОК, морфогенез.

Фітопатогенні мікоплазми, що порушують основні ланки рослинного метаболізму, завдають істотної шкоди продуктивності культурних рослин, яка може знижуватися від 30 до 90 %. Уражені рослини характеризуються карликовістю, здрібненням листків, дрібноплідністю, наявністю «відьминих мітел» [2].

Відомо, що вплив певних чинників на фізіологічні процеси в рослинах, зокрема пшениці, опосередкований змінами їх фітогормонального статусу. Також відома роль фітогормонів у підтриманні фітоімунітету рослин [13]. У зв'язку з цим актуальним є дослідження модельної системи, що включає обробку фітогормонами ІОК і кінетином, оскільки ми передбачали, що ці біологічно активні речовини можуть чинити захисну дію щодо інфікування фітопатогенними молекулами. В цьому сенсі активність компонентів антиоксидантного захисту є непрямым підтвердженням моделювання фітоімунітету, оскільки відомо, що *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 пригнічує активність антиоксидантних ферментів. Водночас доведено, що активність термінальних оксидаз здатна не тільки знизити можливе порушення метаболізму, а й забезпечити максимальну економію енергетичних і структурних ресурсів.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було визначення впливу позакореневої обробки фітогормонами ауксинової (ІОК) і цитокінінової природи (кінетин) на компоненти антиоксидантної системи пшениці, штучно ураженої фітопатогенним молекулом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* штам 118.

Методика

Рослини пшениці-дворучки сорту Зимоярка (селекція Інституту фізіології рослин і генетики НАН України) вирощували протягом 32 діб у пластикових посудинах місткістю 1,5 кг. Посудини набивали ґрунтовою сумішшю «універсальна», що містила торф, пісок, підзолистий ґрунт із вмістом 25–35 % зольних елементів та поживних речовин, мг/100 г: азоту — 25; фосфору — 45; калію — 25; кальцію — 50, а також мікроелементів Zn, Mn, B, Cu. Кислотність суміші рН 6, вологість — 45–60 %. Досліди проводили у триразовій повторності (по 20 рослин на посудину) за такою схемою: 1 — контроль (неінфіковані рослини пшениці без обробки фітогормонами); 2 — рослини пшениці, інфіковані ахолеплазмою *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118 без обробки фітогормонами (інфікування *A. laidlawii*); 3 — рослини пшениці, інфіковані ахолеплазмою *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118 + позакоренева обробка (п.о.) 0,05 %-м розчином кінетину (інфікування *A. laidlawii* + п.о. 0,05 % кінетину); 4 — рослини пшениці, інфіковані ахолеплазмою + позакоренева обробка 0,02 %-м розчином ІОК (інфікування *A. laidlawii* + п.о. 0,02 % ІОК); 5 — позакоренева обробка неушкоджених рослин 0,05 %-м розчином кінетину (п.о. 0,05 % кінетину); 6 — позакоренева обробка неушкоджених рослин 0,02 %-м розчином ІОК (п.о. 0,02 % ІОК).

У дослідах використовували культуру ахолеплазми *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118 (УКМ ВМ-34) з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Позакореневу обробку рослин здійснювали регуляторами росту фітогормональної природи — ІОК та кінетином (НВФ «Сінбіас»).

Рослини пшениці (12-добові) інфікували методом субепідермальної ін'єкції (метод Клементя). Регуляторами росту обробляли позакоренево 29-добові рослини пшениці, в яких через 3 доби після обробки визначали активність антиоксидантних ферментів — каталази (КФ 1.11.1.6) та пероксидази (КФ 1.11.1.7). Через тиждень після обробки дослідних рослин фітогормонами проводили їх морфометричний аналіз, відібравши по 10 рослин із варіанта. Фізіологічний ефект (E_{phy} , %) розраховували за формулою [7]

$$E_{phy} = \frac{M_0 - M_x}{M_x} 100,$$

де M_0 — середня маса або довжина контрольної рослини; M_x — середня маса або довжина рослини, вирощеної після певної обробки.

E_{phy} аналізували з урахуванням його величини, причому ефект міг бути як стимулювальним ($E_{phy} < 0$), так і інгібувальним (фітотоксичним) ($E_{phy} > 0$). Ефект вважали істотним за $E_{phy} \geq 20$ %.

Ферментативну активність каталази й пероксидази аналізували на 20–21-шу добу після зараження *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118. Активність пероксидази визначали за методом Бояркіна в умовних одиницях на 1 мг сирої тканини, каталази — титриметричним методом у мілілітрах O_2 на 1 г за хвилину [4].

Результати та обговорення

Досліджувані фітогормони ІОК і кінетин належать до гормонів стимулювальної природи, які регулюють ріст і морфогенез тканин. Зокрема ІОК стимулює ріст розтягуванням, утворенням додаткових коренів, регулює апікальне домінування, виконує інші важливі функції. З важливою

ТАБЛИЦЯ 1. Вплив позакореневої обробки фітогормонами на морфогенез 36-добових рослин озимої пшениці, уражених фітопатогенною ахлеплазною

Варіант	Морфометричний показник*			
	Довжина листків, см	Довжина коренів, см	Маса сирі речовини листків, г	Маса сирі речовини коренів, г
Контроль	43,1±1,9	4,9±0,6	0,50±0,06	0,015±0,002
Інфікування <i>A. laidlawii</i>	36,8±2,3	5,5±0,5	0,61±0,07	0,017±0,002
п.о. 0,05 % кінетину	47,4±1,9	6,1±0,9	0,65±0,06	0,021±0,005
п.о. 0,02 % ІОК	46,2±1,7	6,2±0,9	0,75±0,07	0,020±0,003
Інфікування <i>A. laidlawii</i> + + п.о. 0,05 % кінетину	44,7±3,1	5,9±0,7	0,62±0,08	0,018±0,001
Інфікування <i>A. laidlawii</i> + + п.о. 0,02 % ІОК	43,8±1,8	5,8±0,5	0,66±0,06	0,019±0,002

П р и м і т к а. Тут і в табл. 2, 3: п.о. — позакоренева обробка; *усереднені дані на 1 рослину (вибірка з 10 рослин).

функцією цитокінінів пов'язують їх участь у процесах росту, диференціації клітин. Під впливом цитокінінів також поліпшується азотне живлення, посилюється інтенсивність фосфорилування, зростає вміст АТФ [13].

За обробки рослин пшениці розчинами фітогормонів 0,02 %-м ІОК і 0,05 %-м кінетину збільшуються довжина й маса окремих органів рослин озимої пшениці, найбільшою мірою — довжина коренів і маса листків (табл. 1).

Виявлено тенденцію до збільшення довжини листків інтактних (контрольних) рослин пшениці в разі їх обробки кінетином, що зростала на 10 %, тоді як за обробки ІОК — на 7,2 %. Довжина коренів рослин за цих умов збільшувалась істотніше — на 24,5 % після обробки кінетином і на 26,5 % — після обробки ІОК. Найвищий ефект від обробки кінетином спостерігався стосовно маси листків і коренів — відповідно на 30 і 40 %. ІОК сприяла наростанню вегетативної маси листків майже на 50 % за збільшення маси коренів на 33,3 % (див. табл. 1). Загальний E_{phy} за дії обох фітогормонів виявився стимулювальним: за дії ІОК E_{phy} становив 32, за дії кінетину — 22 % (табл. 2).

ТАБЛИЦЯ 2. Фізіологічний ефект (E_{phy}) на рослини озимої пшениці за дії регуляторів росту та штучного інфікування фітопатогенною ахлеплазною

Варіант	E_{phy} за масою рослин, %	Реакція	E_{phy} за довжиною рослин, %	Реакція
Контроль	—	Норма	—	Норма
Інфікування <i>A. laidlawii</i>	17	Стимулювання*	11	Інгібування*
п.о. 0,05 % кінетину	22	Стимулювання**	10	Стимулювання*
п.о. 0,02 % ІОК	32	Стимулювання**	8	Стимулювання*
Інфікування <i>A. laidlawii</i> + + п.о. 0,05 % кінетину	19	Стимулювання	5	Норма
Інфікування <i>A. laidlawii</i> + + п.о. 0,02 % ІОК	24	Стимулювання**	3	Норма

*Тенденція до інгібування чи стимулювання ($E_{phy} < 20$). **Істотний фізіологічний ефект ($E_{phy} \geq 20$).

Морфометричним аналізом рослин за штучного ураження *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118 встановлено деяке пригнічення росту листків у довжину — на 14,6 %. Водночас за умов інфікування довжина коренів збільшувалась на 12,2, їх маса — на 13,3, маса листків — на 22 %. Таке нарощення маси уражених рослин швидше за все пов'язане з розростанням дегенеративних клітин флоєми [2]. Підставою для такого припущення стали розрахунки E_{phy} , згідно з якими значного стимульовального чи інгібувального ефекту не встановлено (див. табл. 2), що й не дивно, бо від ураження минуло близько трьох тижнів, а деструктивні зміни накопичуються дуже повільно. Крім того, відомо, що ці патогени здатні існувати в латентному стані і в такому разі симптоми будуть менш вираженими за короткий період часу, але при цьому метаболізм рослин все одно зазнає патогенного впливу [2].

Як ми й очікували, обробка фітогормонами інокульованих *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118 рослин пшениці стимулювала накопичення їх маси, що позначилось на загальному E_{phy} . Так, за обробки уражених рослин ІОК E_{phy} становив 24 % відносно контролю (див. табл. 2). ІОК істотно стимулювала лише зростання листків у довжину — на 21,5 %. Що стосується довжини й маси коренів, то виявлено лише тенденцію до їх збільшення. Обробка кінетином дала такий самий ефект (див. табл. 1).

Як додатковий тест для встановлення дії регуляторів росту на рослини пшениці ми визначали активність компонентів антиоксидантного захисту, оскільки відомо, що *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* штам 118 може пригнічувати їх активність [10].

Антиоксидантна система є механізмом системної стійкості рослин [1, 4, 14, 15]. Разом із супероксиддисмутазою (КФ 1.15.1.1) каталаза й пероксидаза здійснюють комплексний первинний захист. Каталаза й пероксидаза відновлюють пероксид водню до води, використовуючи як відновники різні сполуки [8]. Відомо, що каталазну активність стимулює пероксид водню, що генерується внутрішньоклітинно і значною мірою регенерує кисень, який оксидази можуть використовувати повторно [5], а пероксидаза залучається до специфічних внутрішньоклітинних окиснювальних процесів за участю пероксиду, що призводять до утворення важливих клітинних метаболітів [8]. Також відомо, що активність термінальних оксидаз корелює з фотодиханням, а це захищає фотосинтетичний апарат від фотоокиснення [9, 12].

У попередніх досліджах на заражених 9-добових рослинах озимої пшениці сорту Смуглянка ми встановили загальне зниження активності зазначених термінальних оксидаз, що підтверджувало вплив фітопатогенної ахолеплазми на антиоксидантну систему [6]. На відміну від активності антиоксидантних ферментів тканин листків 9-добових інфікованих рослин у листках 32-добових рослин (на 21-шу добу інфікування ахолеплазмою) пероксидазна активність істотно знижувалась (на 24 %), а каталазна значно підвищувалась (в 2,3 раза). У зв'язку з цим треба підкреслити істотну роль каталази у забезпеченні молекулярним киснем тканин, куди його доступ з тих чи інших причин ускладнений [8]. Відомо також, що фітопатогенні ахолеплазми розмножуються в судинах провідної системи рослин, ускладнюють транспорт асимілятів у провідній системі, стимулюють утворення дегенеративних клітин флоєми, спричинюють гіпертрофію і гіперплазію тканин флоєми, що пов'язано з утворенням великої кількості ситоподібних елементів [2]. Ми припустили, що таке зростання каталазної активності на 21-шу добу ураження рослин пшениці може свідчити про за-

ТАБЛИЦЯ 3. Вплив інфікування ахолеплазмою, обробки індолілоцтовою кислотою та кінетином на активність термінальних оксидаз у листках пшениці

Варіант	Ферментативна активність	
	Пероксидаза, у.о./($\text{г} \cdot \text{с}$)	Каталаза, $\text{мл O}_2/(\text{г} \cdot \text{хв})$
Контроль	0,025±0,001	4,17±0,26
Інфікування <i>A. laidlawii</i>	0,019±0,001	9,49±0,07
п.о. 0,05 % кінетину	0,017±0,001	8,93±0,04
п.о. 0,02 % ІОК	0,022±0,001	7,93±0,41
Інфікування <i>A. laidlawii</i> + + п.о. 0,05 % кінетином	0,029±0,003	9,04±0,27
Інфікування <i>A. laidlawii</i> + + п.о. 0,02 % ІОК	0,016±0,001	8,50±0,35

купорення провідної системи внаслідок розмноження *A. laidlawii* var. *granulum* штам 118 у клітинах досліджуваних рослин.

У результаті виконаної роботи виявлено лише тенденцію до зниження каталазної активності листків за обробки 0,05 %-м розчином кінетину інфікованих ахолеплазмою рослин пшениці — на 4,7 %, а за обробки 0,02 %-м розчином ІОК — на 10,4 % (табл. 3). Пероксидазна активність уражених рослин значно зростала — в 1,5 раза за обробки кінетином і дещо знижувалась (на 15,8 %) за обробки ІОК. Водночас за розрахунками E_{phy} встановлено істотний стимулювальний ефект у разі обробки ІОК (24 % відносно контролю), тоді як за дії кінетину ми виявили лише тенденцію до стимулювання — E_{phy} становив 19 % (див. табл. 2).

За обробки інтактних рослин пшениці цими регуляторами пероксидазна активність дещо знижувалась: на 12 % за обробки ІОК і на 32 % — за обробки кінетином. Каталазна активність неінфікованих рослин як за дії ІОК, так і кінетину, навпаки, зростала більш як удвічі відносно контролю (див. табл. 3).

Отже, обробка інтактних рослин регуляторами росту значно стимулювала каталазну активність листків пшениці. Водночас інокуляція фітопатогенною ахолеплазмою різко підвищувала каталазну активність листків (удвічі) й пригнічувала пероксидазну — на 24 %. При цьому обробка регуляторами росту інфікованих рослин пшениці впливала на активність каталази неістотно, найбільший ефект на пероксидазну активність інфікованих рослин чинив кінетин — вона зростала в 1,5 раза.

Таким чином, встановлено, що позакоренева обробка розчинами фітогормонів стимулює ріст уражених ахолеплазмою рослин пшениці, причому більшому рістстимулювальному ефекту відносно контрольних рослин сприяла обробка 0,02 %-м розчином ІОК (24 %). Водночас обробка 0,05 %-м кінетином істотно збільшувала активність пероксидази (в 1,5 раза) і тим самим сприяла моделюванню фітоімунітету рослин пшениці. У цьому сенсі цікавими є подальші дослідження, зокрема впливу обробки регуляторами росту на фізіолого-біохімічні процеси і формування продуктивності рослин пшениці за умов інокуляції різними фітопатогенними мікроорганізмами.

1. Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Пероксидазная активность выделений здоровых и зараженных пирикулярриозом листьев риса // Докл. РАН. — 1995. — 340, № 5. — С. 702–704.
2. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др. Микроорганизмы — возбудители болезней растений. — Киев: Наук. думка, 1988. — 552 с.

3. Борхсениус С.Н., Чернова О.А. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, патогенность, диагностика. — Л.: Наука, 1989. — 156 с.
4. Воскресенская О.Л. Большой практикум по биоэкологии: Учеб. пособие. Ч. 1. — Йошкар-Ола: Изд-во Мар. гос. ун-та, 2006. — 107 с.
5. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизм действия пероксидазы растений // Успехи биол. химии. — 2006. — 46. — С. 303—322.
6. Гуляева Г.Б., Токовенко І.П., Патыка В.П. Зміни у фотосинтетичному апараті озимої пшениці за дії мікоплазми *A. laidlawii* // Наук. зап. Тернопіл. пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. — 2015. — 62, № 1. — С. 77—83.
7. Лозановская И.Н., Орлов Л.К., Садовникова Л.К. Экология и охрана окружающей среды при химическом загрязнении: Учебник. — М.: Высш. шк., 1998. — 287 с.
8. Мирошниченко О.С. Биосинтез, физиологическая роль и свойства каталазы // Биополимеры и клетка. — 1992. — 8, № 6. — С. 3—25.
9. Николаевский В.С. Эколого-физиологические основы газоустойчивости растений. — М., 1998. — 64 с.
10. Січкач С.В., Коробкова К.С. Активність окислювальних ферментів рослинних клітин за умов експериментального мікоплазмозу // Мікробіол. журн. — 2011. — 73, № 2. — С. 24—28.
11. Січкач С.В., Коробкова К.С. Вплив глікокаліксу клітин молюкутів на активність окремих антиоксидантних ферментів калюсних тканин цукрового буряку // Тези доп. XXII з'їзду т-ва мікробіологів України. — Ужгород, 2009. — С. 338.
12. Стасик О.О. Фотодихання і його фізіологічне значення // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. — К.: Логос, 2009. — Т. 1. — С. 170—199.
13. Ярошенко М. Фітогормони та фітогормональна регуляція рослин // Агронаом. — 2012. — № 2. — С. 40—43.
14. Allen R.G. Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1991. — 196. — P. 117—129.
15. Bolwell G.P., Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense — broad perspective // Physiol. Mol. Plant Pathol. — 1997. — 51. — P. 347—366.

Отримано 02.10.2015

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕЗ И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, ИНФИЦИРОВАННЫХ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR. *GRANULUM* ШТАММ 118

В.Ф. Патыка, Г.Б. Гуляева, І.П. Токовенко, К.С. Коробкова

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины, Киев

В опытах на 32-суточных инфицированных *A. laidlawii* var. *granulum* штамм 118 растениях мягкой пшеницы сорта Зимоярка продемонстрирован стимулирующий эффект ИУК по массе. Инокуляция фитопатогенной ахолеплазмой угнетала пероксидазную активность, в то время как каталазная существенно возрастала. Установлен стимулирующий эффект обработки кинетином на пероксидазную активность листьев пшеницы, пораженной *A. laidlawii* var. *granulum* штамм 118.

INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS ON THE MORPHOGENESIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE LEAVES OF BREAD WHEAT PLANTS INFECTED WITH *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR. *GRANULUM* STR. 118

V.P. Patyka, G.B. Gulyaeva, I.P. Tokovenko, K.S. Korobkova

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine
154 Zabolotno St., Kyiv, D03680, Ukraine

It was shown stimulating effect of IAA on mass accumulation in experiments on 32-daily old Zymoarka variety wheat plants infected by *A. laidlawii* var. *granulum* str. 118. The inhibitory effect of phytopathogenic acholeplasma inoculation on the peroxidase activity and significant increase of catalase activity were revealed. The stimulating effect of kinetin treatment on peroxidase activity in leaves of wheat infected with *A. laidlawii* var. *granulum* str. 118 was observed.

Key words: *Triticum aestivum* L., wheat, *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* str. 118, acholeplasma, phytomycoplasmoses, kinetin, IAA, morphogenesis.