

ЖУК І. В.[✉], ШИЛІНА Ю. В., ДМИТРИЄВ О. П.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: ivzhukvi@gmail.com
[✉] ivzhukvi@gmail.com

ІНДУКЦІЯ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ СТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ БІОТИЧНИМ ЕЛІСАТОРОМ ФЕРУЛОВОЮ КИСЛОТОЮ ТА ДОНОРОМ NO

Мета. Метою роботи було дослідження індукції неспецифічної стійкості *Triticum aestivum* L. біотичним елісатором феруловою кислотою та донором сигнальної молекули NO до природного фону фітопатогенів. **Методи.** Вміст пероксиду водню вимірювали в оброблених елісатором феруловою кислотою та донором NO й інфікованих борошнистою росю листках пшениці озимої сортів «Оберіг Миронівський» та «Світанок Миронівський» протягом вегетаційного періоду. Проведено також морфометричні виміри рослин, оцінку ступеня розвитку хвороби та аналіз структури врожаю. **Результати.** З'ясовано, що дія дослідженого елісатора ферулової кислоти та донора сигнальної молекули оксиду азоту нітропрусиду натрію індукуює різний рівень ендogenous пероксиду водню у листках пшениці, інфікованих збудником борошнистої роси *Erysiphe graminis*. **Висновки.** Отримані дані свідчать про те, що індукція неспецифічної стійкості пшениці *Triticum aestivum* L. феруловою кислотою та донором оксиду азоту нітропрусиду натрію є ефективною, а пероксид водню при цій імунізації зберігає своє значення протягом усього вегетаційного періоду.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., ферулова кислота, NO, індуквана стійкість, борошнеста роса

Стимуляція неспецифічного імунітету рослин, індуквана біотичними елісаторами, може бути дієвим рішенням для упередження втрат врожаю та дотримання норм екологічної безпеки при захисті рослин [1]. Актуальними залишаються пошуки нових ефективних комбінацій біотичних елісаторів та вивчення можливості їх поєднання з регуляторами сигнальних систем рослин. Нашими попередніми дослідженнями встановлена ефективність ферулової кислоти та донора оксиду азоту за штучного зараження пшениці грибним патогеном у польових умовах [2–4], однак на практиці неможливо передбачити расу збудника та його агресивність, тому ви-

пробування з природним фоном індукваної неспецифічної стійкості є доцільним.

Метою нашої подальшої роботи було дослідження індукції стійкості *Triticum aestivum* L. біотичним елісатором та донором сигнальної молекули до природного фону фітопатогенів.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сорти пшениці озимої м'якої *Triticum aestivum* L. – «Оберіг Миронівський», «Світанок Миронівський». Оригінація сортів – Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААН України.

У польовому досліді рослини пшениці обприскували у фазі виходу в трубку водними розчинами ферулової кислоти (0,1 мМ) та донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (0,5 мМ). Ідентифіковано ураження рослин пшениці збудником борошнистої роси *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* Em. *Marchal* (*Blumeria graminis* (DC) *Speer* f. sp. *tritici*).

У якості маркера індукваної стійкості визначали в прапорцевих листках вміст пероксиду водню за реакцією з сульфатом титану [5]. Відбір зразків проводили через добу після зараження і в подальшому протягом періоду колосіння-цвітіння та дозрівання зерна. Для представлення результатів обрано характерні дані, отримані в період найбільшого візуального прояву розвитку хвороби та оцінені за шкалою Саарі-Прескотта [1]. 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 оброблені статистично.

Результати та обговорення

Борошнеста роса стоїть шостою у переліку з десяти грибних захворювань пшениці, боротьба з якими є пріоритетною. Втрати врожаю від неї по всьому світу сягають до 35–62 % [6]. Інфікувати рослини можуть як конідії, так і ас-

коспори; протягом двох годин після адгезії на поверхні листка вже формується гіфа, що проникає у епідермальні тканини за рахунок дії ферментів та тиску.

Вплив збудника борошнистої роси на метаболізм рослинних тканин як біотрофа зумовлює зміни, що призводять до перебудови процесів синтезу, у той час як подальший розвиток гриба призводить до пошкодження листкової поверхні, зменшуючи придатну до фотоасиміляції площу [6]. Ген резистентності пшениці до борошнистої роси (*Pm* ген) *Pm21* кодує типовий NLR білок, що забезпечує широкий спектр стійкості як на стадії проростків, так і у дорослих рослин. За стійкість дорослих рослин (APR) відповідають також ген *LR22a*, що теж кодує NLR білок, та гени *Pm6* and *Pm8* [6]. Тривалий час селекціонери використовували сорти з пшенично-житньою транслокацією, однак сучасні сорти потребують нових пошуків через адаптацію патогенів та зміни клімату.

Під час захисних реакцій рослин на атаку фітопатогенів відбувається розпізнавання молекулярних маркерів патогенів PAMP за участю системи PRR і активація локалізованої у плазматичній мембрані NADPH оксидази та апопластних пероксидаз типу III. Швидка генерація пероксиду водню, який може надходити з апопласту до цитозолу через аквапорини плазматичної мембрани, є частиною як окиснювального вибуху, так і більш пізніх реакцій.

Відомо, що у фотосинтезуючих тканинах найбільша концентрація внутрішньоклітинного пероксиду водню знаходиться у пероксисомах, а головним джерелом утворення H_2O_2 є фотодихання, що посилюється за біотичного стресу [7]. Регуляція рівня ендогенного пероксиду водню здійснюється антиоксидантними ферментами, зокрема каталазою та аскорбатпероксидазою з аскорбат-глутатіонового циклу [7–9]. Таким чином, пероксид водню як вторинний месенджер пов'язаний зі станом фотосинтезуючого апарату рослин. Сигнальні шляхи оксиду азоту та пероксиду водню перетинаються. Зокрема, супероксиддисмутаза пероксисом здатна регулювати накопичення пероксинітриту – результату взаємодії активного кисню з оксидом азоту NO [10]. Встановлено, що і оксид азоту, і пероксид водню впливають на метаболізм клітини через індуквані ними як вторинними месенджерами модифікації білків [7–10].

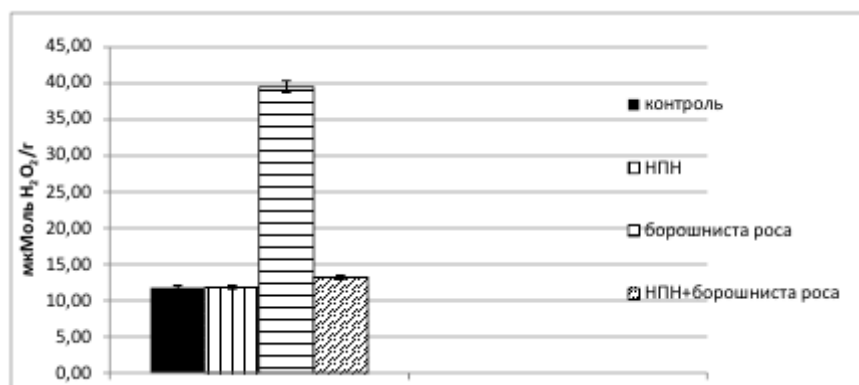
З'ясовано, що у рослин пшениці озимої, інфікованих за природного фону збудником бо-

рошнистої роси, у сортів «Світанок Миронівський» та «Оберіг Миронівський» було зниження вмісту ендогенного пероксиду водню за дії донора оксиду азоту на 67 % та 69 % відповідно (рис. 1 А та рис. 2 А). Відомо, що на ранніх етапах проникнення фітопатогенів «окиснювальний вибух» є однією із захисних реакцій проти інфекційних агентів. Встановлено, що грибні патогени в свою чергу здатні впливати на антиоксидантний статус рослин задля забезпечення власного розвитку та поширення збудника по тканинах [11]. На графіках представлено дані у тій фазі розвитку збудника, коли вже спостерігали візуальні прояви борошнистої роси на листках. Зниження рівня АФК в період візуальних проявів ознак грибного захворювання порівняно з вмістом в інфікованих, але не оброблених донором оксиду листках пшениці, свідчить про зменшення стресового навантаження практично до рівня контролю. Як це корелювало з рівнем розвитку хвороби?

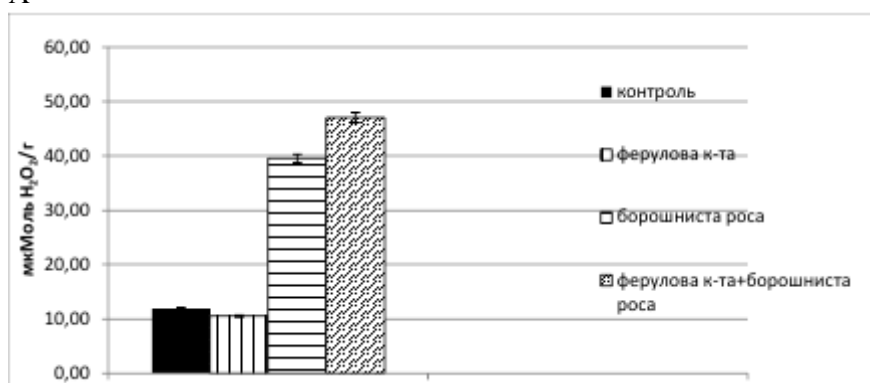
Встановлено також, що адаптаційні можливості рослин залежали від генотипу – доведена істотна різниця між ендогенним вмістом пероксиду водню в обох досліджених сортах пшениці озимої у контрольних варіантах. Таким чином, за цим біохімічним критерієм сорт «Оберіг Миронівський» у польових умовах мав стабільно вищі показники, ніж сорт «Світанок Миронівський». З'ясовано, що в обох досліджених сортах знижувався ступінь ураження листків пшениці, що позитивно впливало на реалізацію продуктивності.

Отже, зниження рівня біотичного стресу, зумовлене регуляцією неспецифічного імунітету, здатне зупинити розвиток патологічного процесу в рослинних тканинах та перешкоджати ушкодженню й зменшенню продуктивності.

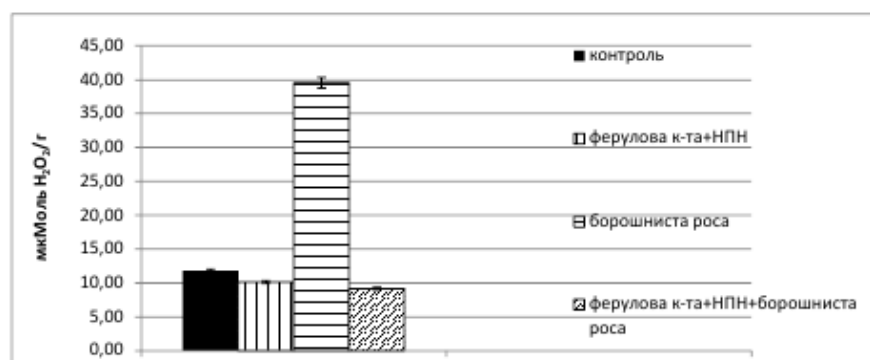
Вплив ферулової кислоти відрізнявся від впливу донора оксиду азоту: у сорту «Світанок Миронівський» встановлено збільшення пулу ендогенного пероксиду водню в інфікованих збудником борошнистої рослинах на 19 %, а у сорту «Оберіг Миронівський» – зниження на 71 % (рис. 1 Б, 2 Б). Ферулова кислота відома як антиоксидант, також вона є одним із компонентів клітинної стінки, для синтезу якої залучені ферменти пероксидази. Можливо, що саме індукція посиленої лігніфікації клітинних стінок як захисного бар'єра проти поширення інфекції по рослині [12] зумовлює такий ефект ферулової кислоти.



А



Б



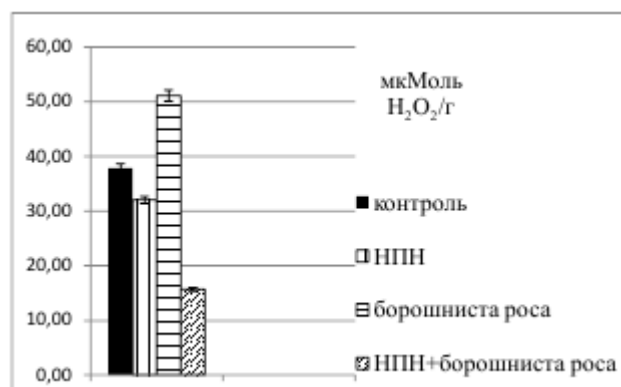
В

Рис. 1. Вміст ендogenous пероксида водню в прапорцевих листках пшениці озимої сорту «Світанок Миронівський» за природного інфікування збудником борошнистої роси та обробки біотичним еліситором феруловою кислотою та донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію (НПН) – та сумісно обома речовинами (А – НПН; Б – ферулова кислота; В – ферулова кислота+НПН).

Сумісна дія донора оксиду азоту та ферулової кислоти за ураження борошнистою росою знижувала вміст ендogenous пероксида водню у сорту «Світанок Миронівський» на 77 %, у сорту «Оберіг Миронівський» – на 68 % (рис.1 В, 2 В).

Розвиток ураження збудником борошнистої роси в обох сортів пшениці озимої найбільше стримувала комбінація біотичного еліситора ферулової кислоти та донора сигнальної молекули оксиду азоту. Зниження ступеня пошкодження листків пшениці борошнистою росою за

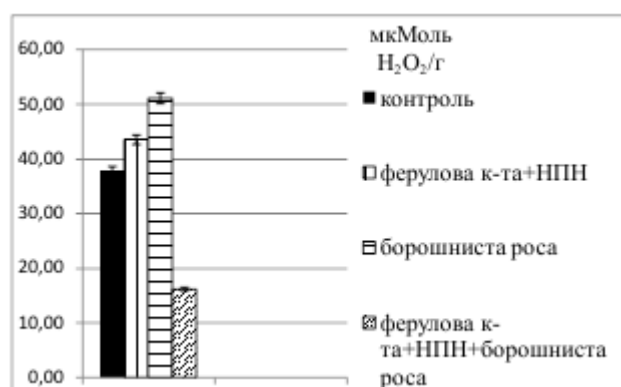
шкалою Саррі-Прескотта становило 1–2 бали, що відповідає до 20 % площі листової поверхні. З'ясовано, що сорт пшениці озимої «Світанок Миронівський» був більш чутливим як до ураження, так і до індукції неспецифічної стійкості до фітопатогенів (порівняно із сортом «Оберіг Миронівський»). Встановлено, що обробка кожною з досліджених речовин стимулювала неспецифічний імунітет пшениці озимої до борошнистої роси, однак їх комбінація проявляла синергічний ефект.



А



Б



В

Рис. 2. Вміст ендогенного перексиду водню в прапорцевих листках пшениці озимої сорту «Оберіг Миронівський» за природного інфікування збудником борошнистої роси та обробки біотичним еліситором феруловою кислотою та донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію (НПН) – та сумісно обома речовинами (А – НПН; Б – ферулова кислота; В – ферулова кислота+НПН).

Також було встановлено, що в обох сортах пшениці комбінація еліситора та донора сигнальної молекули стимулювала ріст прапорце-

вих листків, зростала продуктивність на 10–15%. При цьому донор оксиду азоту збільшував кількість зернівок у колосі, а ферулова кислота збільшувала їх наповненість, зростання маси 1000 зерен. Таким чином, за максимальних проявів розвитку грибного захворювання борошнистої роси дія біотичного еліситора сумісно з донором сигнальної молекули знижувала вміст ендогенного перексиду водню. Імуностимуляція біотичними еліситорами пшениці зумовлена не лише хімічною природою еліситора та його впливом на метаболізм рослин, але й генотиповими характеристиками сортів, трофністю фітопатогенів, чутливістю фаз онтогенезу до обробки.

Сучасні погляди на генетичний потенціал стійкості пшениці до борошнистої роси та механізми функціонування внутрішньоклітинного сигналіну за біотичного стресу значно розширюються [13–15]. Роль перексиду водню як месенджера при цьому зростає, а дія біотичних еліситорів дозволяє змінити стратегії захисту рослин для активації комплексної неспецифічної стійкості.

Висновки

1. Імуностимуляція біотичними еліситорами пшениці ефективна в польових умовах за природного фону патогенів. Комбінація біотичного еліситора ферулової кислоти та донора оксиду азоту нітропрусиду натрію стимулювала неспецифічну стійкість проти збудника борошнистої роси з природного фону.

2. Ефект впливу індуктора на метаболізм рослини зумовлений не лише хімічною природою еліситора, але й генотиповими характеристиками сортів рослин.

3. Роль ендогенного перексиду водню у неспецифічному захисті листків пшениці від грибних фітопатогенів є важливою протягом усього вегетаційного періоду, зменшення пулу H_2O_2 та рівня окиснювального стресу супроводжувалося зниженням ураженої площі поверхні листків та стимулюванням реалізації продуктивності пшениці.

Висловлюю подяку в організації дослідження та ідентифікації захворювання борошниста роса в польових умовах Лісовій Г. М., Кучеровій Л. О. з Інституту захисту рослин НААН України.

References

1. Babayants O.V., Babayants L.T. Basis of selection and methodology of wheat tolerance estimation to diseases agents. Odessa, 2014. 401 p. [in Russian]

2. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M., Kucherova L.O. Participation of ferulic acid in elicitation of winter wheat plants resistance against *Septoria tritici* infection. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2017. Vol. 20. P. 190–193. doi: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v20.761>. [in Ukrainian]
3. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M., Kucherova L.O. The combination of NO donor and ferulic acid effect on the elicitation of *Triticum aestivum* tolerance against *Septoria tritici*. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2018. Vol. 23. P. 240–245. doi: 10.7124/FEEO.v22.955. [in Ukrainian]
4. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Shylina J.V., Lysova G.M., Kucherova L.O. The estimation of organic acids effectiveness as biotic elicitors via changes of endogenous peroxide content. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2020. Vol. 26. P. 202–206. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1266>. [in Ukrainian]
5. Chen L.-M., Kao Ch.-H. Effect of excess copper on rice leaves: evidence involvement of lipid peroxidation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1999. Vol. 40. P. 283–287.
6. Foyer C.H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>.
7. Appiano M., Catalano D., Martinez M. S., Lotti C., Zheng Z., Visser R. G. F., Ricciardi L., Bai Y., Pavan S. Monocot and dicot MLO powdery mildew susceptibility factors are functionally conserved in spite of the evolution of class-specific molecular features. *BMC Plant Biology*. 2015. Vol. 15. P. 257. doi: 10.1186/s12870-015-0639-6.
8. Liu Z., Zhao Y; Wang X., Yang M., Guo C., Xiao K. *TaNBPI*, a guanine nucleotide-binding subunit gene of wheat, is essential in the regulation of N starvation adaptation via modulating N acquisition and ROS homeostasis. *BMC Plant Biology*. 2018. Vol. 18. P. 167. doi: 10.1186/s12870-018-1374-6.
9. Goto Y., Maki N., Sklenar J., Derbyshire P., Menke F.L.H., Zipfel C., Kadota Y., Shirasu K. The phagocytosis oxidase/Bem1p (PB1) domain-containing protein PB1CP negatively regulates the NADPH oxidase RBOHD in plant immunity. *bioRxiv*. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.28.423414>.
10. Wu F., Chi Y., Jiang Z., Xu Y., Xie L., Huang F. et al. Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature*. 2020. Vol. 578. P. 577–581. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2032-3>.
11. Bleau J.R., Spoel S.H. Selective redox signaling shapes plant-pathogen interactions. *Plant Physiology*. 2021. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab088>.
12. Gallego-Giraldo L., Posé S., Sivakumar P., Peralta A G. Hahn M. G., Ayre B.G., Sunuwar J., Hernandez J., Patel M., Shah J., Rao X., Knox J.P., Dixon R.A. Elicitors and defense gene induction in plants with altered lignin compositions. *New Phytologist*. 2018. Vol. 219. P. 1235–1251. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.15258>.
13. Smirnov N., Arnaud D. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*. 2019. Vol. 221. P. 1197–1214. doi: 10.1111/nph.15488.
14. Kang Y. Zhou M., Merry A., Barry K. Mechanisms of powdery mildew resistance of wheat – a review of molecular breeding. *Plant Pathology*. 2020. Vol. 69. P. 601–617. doi: 10.1111/ppa.13166.
15. Sandalio L.M., Peláez-Vico M.A., Molina-Moya E., Romero-Puertas M.C. Peroxisomes as redox-signaling nodes in intracellular communication and stress responses. *Plant Physiol*. 2021. doi: 10.1093/plphys/kiab060.

ZHUK I.V., SHYLINA Ju.V., DMYTRIEV A.P.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Natl. Acad. Sci. Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: ivzhukvi@gmail.com

THE ACTIVATION OF WHEAT RESISTANCE AGAINST POWDERY MILDEW BY COMBINATION OF BIOTIC ELICITOR AND NO DONOR

Aim. The aim of research was to analyze the activation of *Triticum aestivum* L. non-specific resistance by the effect of ferulic acid and NO on H₂O₂ content against fungal pathogen from environment in field trials. **Methods.** Content of endogenous H₂O₂ was measured in elicitor treated and infected wheat plants (cv. Oberig myronivskij and Svitanok myronivskij) during different ontogenesis phases. The extent of disease development, morphometric parameters and yield structure were analyzed. **Results.** The data obtained suggest that different levels of endogenous hydrogen peroxide were induced in wheat leaves by treatment. The growth and yield were stimulated. The infection damage decreased. **Conclusions.** The role of endogenous hydrogen peroxide is crucial for wheat defense during all vegetation period. The elicitor and donor NO induced effective defense responses and resistance in winter wheat against *Erysiphe graminis*. **Keywords:** *Triticum aestivum* L., ferulic acid, NO, induced resistance, powdery mildew.