

ЗНАЧЕНИЕ КАЛЛОЗЫ И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ТИМОФЕЕВА ОТ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ

Пожерукова В.Е., Плотникова Л.Я.

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия, e-mail: lplotnikova2010@yandex.ru

Образцы *Triticum timopheevii* Zhuk. состоят из растений, различающихся устойчивостью к бурой ржавчине, вызываемой грибом *Puccinia triticina* Erikss. При заражении урединиоспорами *P. triticina* двух образцов *T. timopheevii* выявлен набор вариантов взаимодействия, повторяющийся у разных растений. Развитие части колоний (от 10 до 35%, в зависимости от растения) сопровождалось реакцией сверхчувствительности (СВЧ). Отложения каллозы на клеточных стенках появлялись через 3 суток после инокуляции и были тесно связаны с накоплением в тканях перекиси водорода H_2O_2 и проявлением реакции СВЧ. Эти реакции приводили к гибели гриба после внедрения в единичные клетки растений или сдерживанию роста на поздних этапах патогенеза. В большинстве случаев (65-75%) патоген отмирал на стадиях проникновения в устьица или развития в тканях до аккумуляции H_2O_2 и каллозы.

Ключевые слова: *Triticum timopheevii*, *Puccinia triticina*, каллоза, H_2O_2

SIGNIFICANCE OF CALLOSE AND HYDROGEN PEROXIDE IN PROTECTION OF TIMOPHEEVI WHEAT AGAINST BROWN RUST

Pozherukova V.E., Plotnikova L.Y.

Omsk State Agrarian University n.a. P.A. Stolypin, Omsk, Russia, e-mail: lplotnikova2010@yandex.ru

Accessions of *Triticum timopheevii* Zhuk. consist of plants differed in resistance to leaf rust caused by the fungus *Puccinia triticina* Erikss. When two *T. timopheevii* accessions were infected with urediniospores of *P. triticina* a set of interactions, recurring in different plants, was revealed/ The development of parts of colonies (10 to 35%, depending on the plant) was accompanied by hypersensitivity reactions (HR). Callose depositions on the cell walls appeared 3 days after inoculation and were closely related to the accumulation of hydrogen peroxide H_2O_2 in the tissues and HR. These reactions have led to the death of the fungus after penetration into few plant cells or deceleration at late stage of pathogenesis. In most cases (65-75%) the pathogen was inhibited at the stages of penetration into the stomata or development in the tissues to H_2O_2 and callose accumulation.

Keywords: *Triticum timopheevii*, *Puccinia triticina*, callose, H_2O_2

Бурю ржавчину пшеницы вызывает биотрофный паразитический гриб *Puccinia triticina* Erikss. Микроэволюционные процессы в популяциях *P. triticina* приводят к регулярному появлению новых вирулентных рас и преодолению устойчивости растений. Для создания сортов с длительной устойчивостью актуально исследование комплекса механизмов, стабильно защищающие иммунные виды от патогенов.

Мало окультуренный вид *Triticum timopheevii* Zhuk. отличается иммунитетом к грибным болезням и считается одним из перспективных доноров генов устойчивости [1]. Защитные механизмы пшеницы Тимофеева к ржавчине мало изучены. Ранее была исследована генерация активных форм кислорода (АФК) в инфицированных *P. triticina* листьях *T. timopheevii*. Установлено, что в течение двух суток после инокуляции в тканях накапливался супероксид-анион $O_2^{\cdot-}$, позже – перекись водорода H_2O_2 [7].

Для расширения представлений о механизмах устойчивости *T. timopheevii* к ржавчинным грибам представляет интерес изучение роли полисахарида каллозы (β -1,3-

глюкан) во взаимодействиях. Синтез каллозы может быть индуцирован абиотическими стрессами и обработкой элиситорами различных патогенов. Полисахарид откладывается на клеточных стенках, образуя барьер для проникновения веществ. Доказано участие каллозы во многих физиологических процессах растений (регуляция деятельности сидовидных клеток и плазмодесм, формирование срединной пластинки во время клеточных делений и др.) [2].

Синтез каллозы считают самостоятельным защитным механизмом, подавляющим или ограничивающим развитие патогенных грибов [8]. Взаимосвязь синтеза каллозы с другими защитными механизмами мало исследована. В связи с этим задачами работы были исследование роли каллозы в защите *T. timopheevii* от бурой ржавчины, а также выявление взаимосвязи между синтезом каллозы и накоплением перекиси водорода H_2O_2 .

Материалы и методы исследований

Объектами исследований были образцы *Triticum timopheevii* Zhuk. к-30920 и к-38555 из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). В качестве контроля использовали восприимчивый к бурой ржавчине сорт Памяти Азиева яровой мягкой пшеницы *T. aestivum* L. Для заражения использовали инокулюм популяции *P. triticina*, собранный на сортах мягкой пшеницы в Западной Сибири (г. Омск) в 2013 г. и размноженный в лаборатории. Опыты проводили на растениях в стадии проростков по бензимидазольной методике [4]. Тип реакции растений определяли через 10 суток после инокуляции (п/ин) по 5-балльной шкале: балл 0-2 – устойчивость, 3-4 – восприимчивость [10].

Цитологические исследования проводили на листьях, фиксированных лактофенолом через 1; 2; 3; 5, 10 суток после инокуляции (п/ин). Локализацию H_2O_2 определяли путем витального окрашивания листьев 0,02 %-ым водным раствором 3,3'-диамино-бензидин тетрагидрата (ДАБ) («Sigma», США) с помощью вакуум-инфильтрации, через 30 мин материал фиксировали в лактофеноле. В присутствии ДАБ H_2O_2 образовывала вишнево-красное соединение [9]. Для выявления структур гриба и реакции СВЧ листья окрашивали 1%-ным анилиновым синим в лактофеноле, затем дифференцировали окраску насыщенным водным раствором хлоралгидрата, при этом структуры гриба и отмершие клетки растения окрашивались в синий цвет. Присутствие полисахарида каллозы выявляли окрашиванием тех же листьев 1%-ным кораллином (аурин) в 4%-ном водном растворе соды Na_2CO_3 в течение 20-30 мин, затем дифференцировали окраску в растворе соды, при этом каллоза окрашивалась в красно-розовый цвет [5]. Размеры колоний и пустул, зон образования каллозы и H_2O_2 измеряли с помощью окуляр-микрометра, их площадь вычисляли по формуле площади эллипса. Цитологические исследования проводили на 10-ти растениях каждого образца *T. timopheevii*, а также 5-ти растениях мягкой пшеницы с помощью

светового микроскопа Axioscop («Carl Zeiss», ФРГ). В статье приведены средние значения по данным и их стандартные ошибки.

Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе работы был определен тип реакции растений на заражение *P. triticina*. На листьях восприимчивого сорта *T. aestivum* (контроль) формировались крупные пустулы (балл 4). Большинство растений (70%) образца к-38555 были иммунны, на их листьях пустулы гриба не развивались, появлялись лишь мелкие некротические пятна (балл 0), а на остальных образовывались мелкие пустулы, окруженные зонами отмершей ткани (балл 1). Образец к-30920 был более восприимчив в болезни, в нем 30% растений были иммунны, на остальных развивались пустулы, окруженные зонами некроза или хлороза (баллы 1-3).

Цитологические исследования показали, что на листьях восприимчивого сорта мягкой пшеницы споры образовывали ростковые трубки, которые двигались к устьицам и образовывали на них аппрессории для проникновения гриба в ткани. Затем в тканях развивался мицелий с большим числом гаусторий (рис. 1 а), а через 10 сут п/ин формировались большие пустулы (средняя площадь $371,2 \pm 49,1$ тыс. $\mu\text{м}^2$) (рис. 1 б).

Выявлено несколько вариантов взаимоотношений пшеницы Тимофеева с *P. triticina*:

I – остановка развития гриба на поверхности листа на стадии ростковой трубки;

II – отмирание патогена после контакта с устьицами на стадиях аппрессория, подустьичной или инфекционной гифы (рис. 1 в);

III – гибель колоний после внедрения гаусторий в единичные клетки растений и отмирания их в результате реакции СВЧ;

IV – подавление образования гаусторий, замедление роста и абортация колоний через 3-5 сут п/ин без проявления реакции СВЧ (рис. 1 д);

V – развитие колоний и формирование пустул меньшего размера, чем в контроле (в к-3855 – в 11 раз; в 30920 – в 4-8 раз) (рис. 1 е). На восприимчивых растениях (балл 3) в зоне колоний и пустул признаков несовместимости до спороношения не отмечено. На устойчивых растениях (балл 1-2) в центре части колоний отмечена гибель единичных клеток растений в результате реакции СВЧ, но гифы гриба выходили за пределы зоны некроза (рис. 1 г).

Таким образом, на растениях *T. timopheevii* существенная доля инокулюма (15-40%) гриб погибал до внедрения в клетки растения (варианты I, II), в вариантах III, IV и V образовывал разветвленный мицелий, но пустулы появлялись только в варианте V. Описанные варианты взаимодействия в разных сочетаниях и соотношениях установлены в растениях двух образцов *T. timopheevii* (рис. 2 а, б). Эти результаты подтверждают ранее полученные данные о полиморфизме растений *T. timopheevii* по признаку устойчивости к

болезни, а также о характерных способах взаимодействия *P. triticina* с растениями [6]. Однако результаты взаимодействия образцов с популяциями 2011 и 2013 гг. количественно отличались, что может быть объяснено как случайным выбором семян для экспериментов, так и изменением состава популяции *P. triticina*.

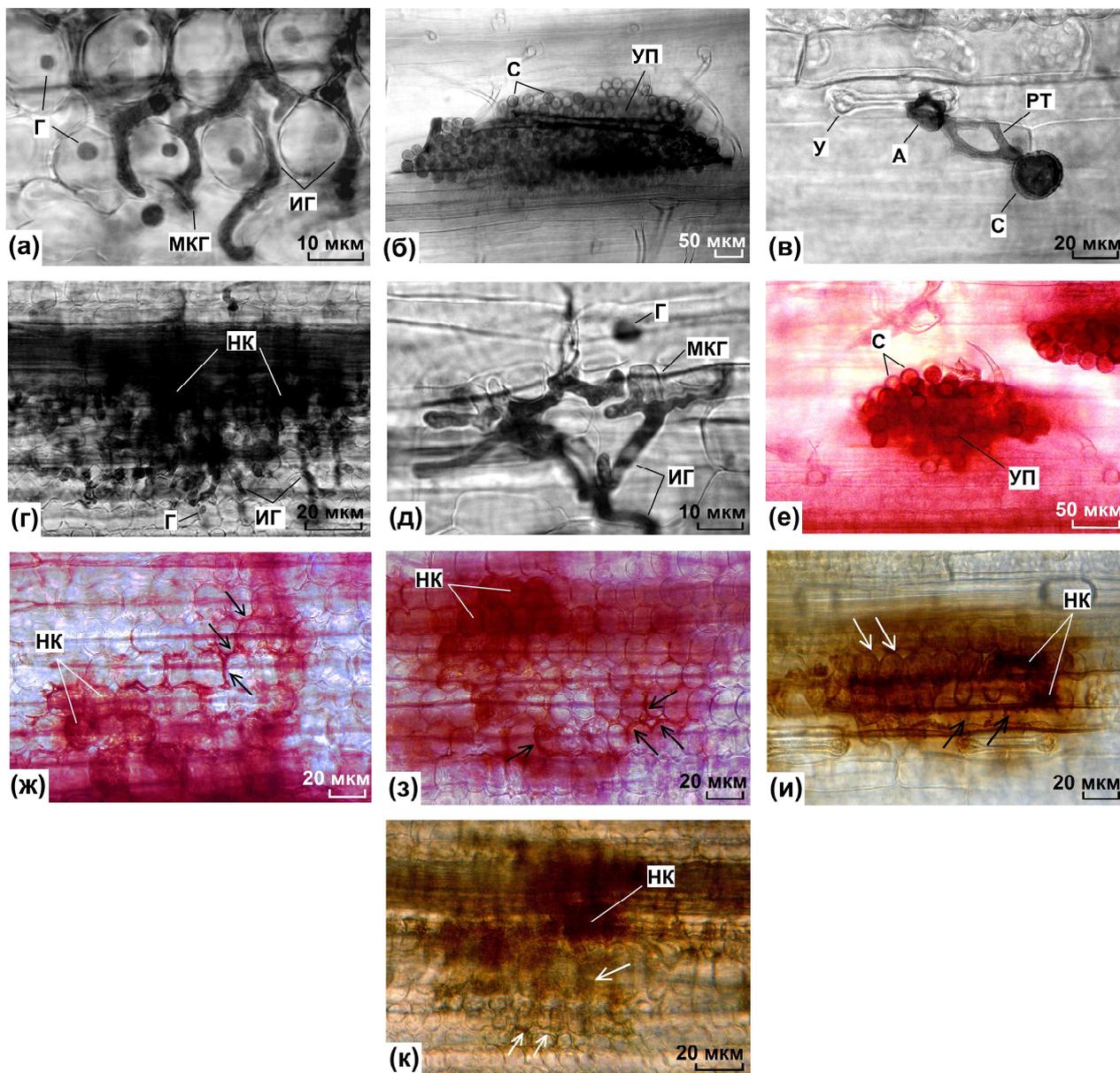


Рис.1. Особенности развития *P. triticina* и реакций растений *Triticum aestivum* (а, б) и *T. timopheevii* (в - к): а – мицелий в листе восприимчивого сорта; б – пустула на листе восприимчивого сорта; в – аппрессорий, погибший на устьице; г – колония в листе устойчивого растения, инфекционные гифы выходят за зону реакции СВЧ; д – abortивная колония с вакуолизированными клетками; е – маленькая пустула на листе восприимчивого растения, окруженная клетками с отложениями каллозы; ж – каллоза на стенках клеток растения, погибших в результате реакции СВЧ, и локальные отложения в местах контакта с отмирающими гифами (стрелки) (5 сут п/ин); з – отложения каллозы в зоне колоний с реакцией СВЧ и без нее (стрелки) (10 сут п/ин); и – аккумуляция H_2O_2 в цитоплазме, на стенках клеток (белые стрелки) и в межклеточном пространстве (черные стрелки); к – интенсивная аккумуляция H_2O_2 в зоне реакции СВЧ и слабое накопление в зоне колонии, погибшей независимо от реакции СВЧ (стрелки).

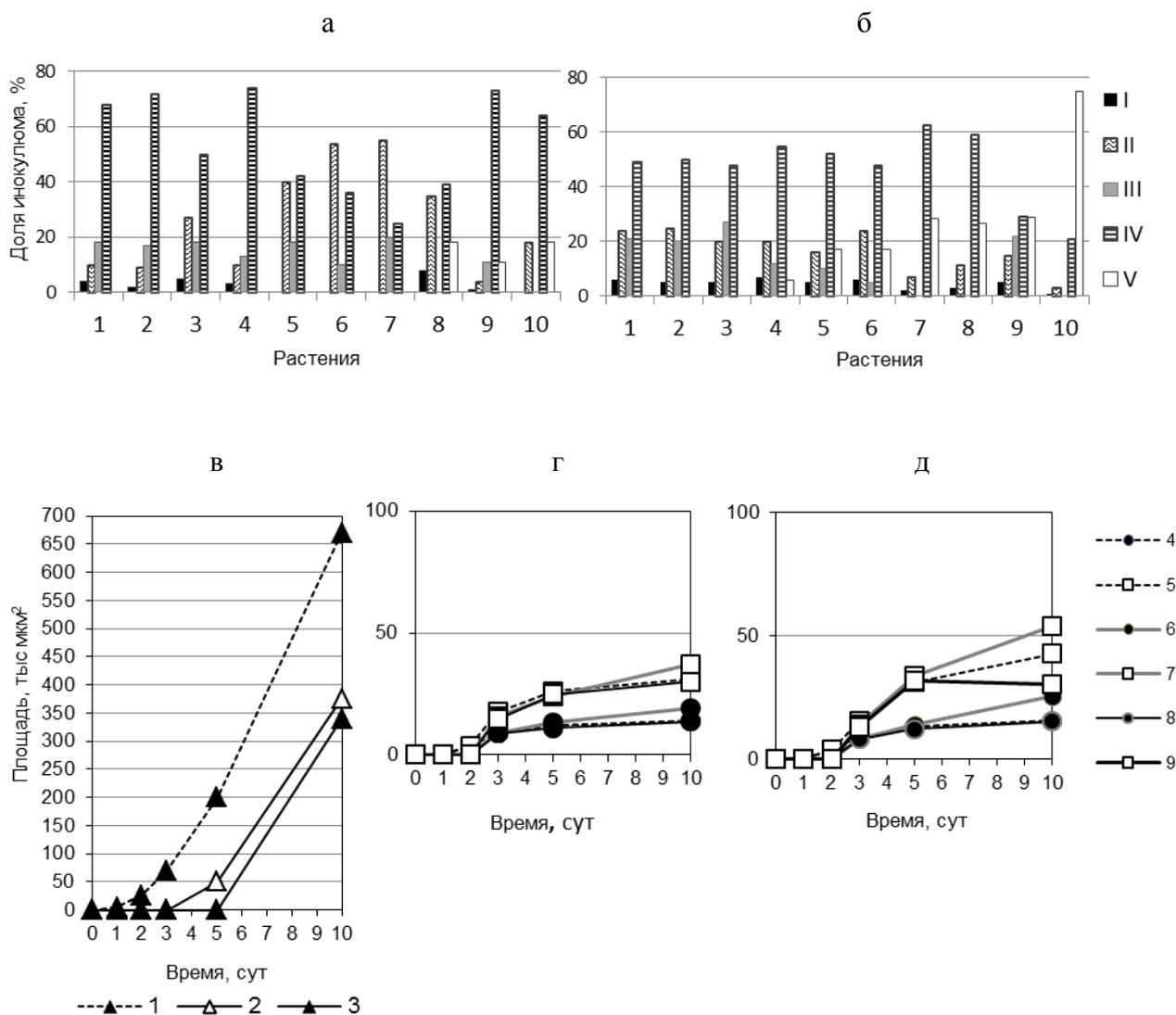


Рис. 2. Особенности взаимодействия *P. triticina* с *T. timopheevii* к-38555 (а, г), к-30920 (б, д) и *T. aestivum* (в): а, б – соотношение вариантов взаимодействия (I–V) гриба с растениями (от нанесенного инокулята); в – д – динамика роста мицелия (1, 4, 5), увеличения зон синтеза каллозы (2, б, 7) и аккумуляции H_2O_2 (3, 8, 9).

Изучение динамики развития колоний показало, что в восприимчивом сорте пшеницы мицелий в течение первых 2 сут п/ин занимал малую площадь, затем скорость распространения мицелия резко увеличивалась. Значимые различия в динамике развития колоний между контролем и несовместимыми вариантами взаимодействия III, IV проявились через 2 сут п/ин (рис. 2 в-д). Цитохимические исследования показали, что в зараженных листьях мягкой пшеницы (контроль) слабый синтез каллозы отмен только в тканях под пустулами. Сходные отложения каллозы отмечены под пустулами на листьях *T. timopheevii* (рис. 1 е).

При изучении развития *P. triticina* на *T. timopheevii* внимание было сосредоточено на взаимодействиях, приводящих к ингибированию патогена (варианты I-IV). Не установлено

накопления каллозы при остановке развития гриба на поверхности листа и при попытке внедрения в устьица *T. timopheevii* (варианты I, II). Интенсивные отложения каллозы обнаружены на стенках клеток растений, погибших в результате реакции СВЧ, через 3 сут п/ин и позднее (вариант 3) (рис. 1 ж). Для варианта IV было характерно интенсивное подавление образования гаусторий и отмирание колоний через 3-5 сут п/ин. В этом случае синтез каллозы был выражен слабее, чем в варианте III, проявлялся после замедления и прекращения роста колоний, преимущественно на участках стенок, контактировавших с вакуолизированными гифами. К концу эксперимента отложения становились толще. Зоны синтеза каллозы в вариантах III и IV были тесно взаимосвязаны с размерами колоний. К концу эксперимента усиливался синтез каллозы на стенках клеток вокруг колоний (рис. 2 г, д).

Ранее было установлено, что в зараженных бурой ржавчиной растениях *T. timopheevii* через 3-10 сут п/ин накапливалась H_2O_2 [7]. Известно, что АФК являются мессенджерами сигнальной трансдукции и участвуют в активации набора защитных реакций [3]. В связи с этим была изучена взаимосвязь между продукцией H_2O_2 и синтезом каллозы. При совместимом взаимодействии *P. triticina* с мягкой пшеницей и *T. timopheevii* слабое накопление H_2O_2 отмечено только в момент спороношения под пустулами, в меньшей зоне, чем синтез каллозы (рис. 2 в). В вариантах взаимодействия I и II H_2O_2 не выявлена. Однако при взаимодействиях, сопровождающихся реакцией СВЧ (вариант III), отмечено интенсивное накопление H_2O_2 в зоне колонии, сначала в цитоплазме погибших клеток, позже – на клеточных стенках и в межклеточном пространстве (рис. 1 и). В варианте IV умеренное накопление H_2O_2 обнаружено в цитоплазме клеток в центре колоний, а на периферии колоний АФК накапливались на клеточных стенках в местах контакта с отмирающими вакуолизированными гифами (рис. 1 к). Таким образом, распределение каллозы и H_2O_2 в тканях, а также интенсивность их синтеза в двух образцах *T. timopheevii* были сходны.

Защитные реакции преимущественно проявлялись в зоне распространения мицелия (рис. 2 в-д). Корреляционный анализ показал для вариантов III и IV тесную взаимосвязь между размерами колоний и зонами каллозных отложений ($r = 0,86-0,99$) (таблица). Отмечена также высокая положительная корреляция между размерами зон синтеза каллозы и H_2O_2 (10 сут п/ин) ($r = 0,74-0,99$). В тоже время в варианте V установлена отрицательная корреляция между размерами каллозных отложений и колоний. На стенках клеток растений вокруг небольших пустул наблюдались каллозные отложения, а по мере увеличения размеров колоний и пустул зоны синтеза каллозы сокращались.

Коэффициенты корреляции (r) между площадью колоний и зонами синтеза каллозы и H₂O₂ при разных вариантах взаимодействия *P. triticina* с растениями *T. timopheevii*

Образец	Варианты взаимодействия				
	I	II	III	IV	V
S колонии - S каллозы					
к-30920	-	-	0,91	0,99	-0,71
к-38555	-	-	0,99	0,86	-0,82
S каллозы - S H ₂ O ₂					
к-30920	-	-	0,98	0,99	0,74
к-38555	-	-	0,95	0,96	0,81

В связи с биологическими свойствами каллозы предполагается ее двойственное защитное действие в патогенезе: 1) участие в образовании физического барьера, восстанавливающего целостность поврежденной клеточной стенки; 2) создание слоя, препятствующего поглощению питательных веществ из клеток хозяина [8]. Известно, что содержание каллозы в клетках растений динамически изменяется и зависит от активности ферментов с противоположным действием: каллозосинтетаза обеспечивает синтез каллозы, а β-1,3-глюканазы разрушают полисахарид при изменении физиологического состояния или после исчезновения индуктора. На клеточных культурах показано, что значительное повышение содержания каллозы происходило уже через 2-4 часа после обработки индукторами, а затем содержание каллозы в клетках снижалось в результате действия глюканаз [2]. На примере культуры клеток сои показано, что синтез каллозы зависит от поступления Ca²⁺-ионов в цитоплазму [2]. В настоящее время известно, что ионные потоки и поляризация мембраны также необходимы для образования АФК – мессенджеров сигнальных систем, запускающих комплекс защитных реакций, включая укрепление клеточных стенок [3].

В наших экспериментах было показано, что большая часть инокулюма, нанесенного на растения *T. timopheevii*, погибала на разных стадиях патогенеза, что может быть связано с проявлением различных защитных механизмов. Интенсивный синтез каллозы был тесно связан с проявлением реакции СВЧ и накоплением в погибших клетках H₂O₂. Эти события совпадали по времени с подавлением развития мелких колоний после образования нескольких гаусторий (вариант взаимодействия II), а также с замедлением развития колоний на поздних этапах патогенеза (вариант V). Эти результаты согласуются с данными изучения взаимодействия ржавчинного гриба *Uromyces vignae* Barclay. с иммунными сортами вигны. Показано, что гриб прекращал развитие после внедрения единичных гаусторий и гибели клеток растений в результате реакции СВЧ, при этом каллозные отложения появлялись вокруг гаусторий и на стенках погибших клеток [8], а в цитоплазме клеток растения накапливалась перекись водорода [9].

В наших экспериментах было показано, что гибель существенной доли аппрессориев не была связана с синтезом H_2O_2 и каллозы (вариант II). Ранее было установлено, что на этой стадии взаимодействия основной защитной реакцией иммунных растений является образование супероксид-аниона, разрушающего структуры гриба [7]. Значительная часть колоний (от 25 до 75%), развивавшихся на растениях *T. timopheevii*, погибала независимо от реакции СВЧ (вариант IV). Ранее было показано, что гибель таких колоний связана с подавлением формирования гаусторий и голоданием паразита [7]. Вероятно, слабое накопление H_2O_2 и каллозы имело неспецифический характер и было связано с реакцией на элиситоры, выделявшиеся из отмирающих клеток гриба. Ранее на примере взаимодействия *U. vignae* было показано, что усиление синтеза каллозы вокруг гаусторий происходит после инактивации антибиотиками или старения этих структур [8].

В проведенных исследованиях установлена тесная взаимосвязь между интенсивностью синтеза перекиси водорода и каллозы, а также локализацией этих защитных веществ в тканях. Известно, что уровень АФК в клетке регулируется многокомпонентной про/антиоксидантной системой, обеспечивающей накопление окислителей в местах инфекции для ингибирования патогенов, а также предотвращающих распространение токсичных молекул в соседние клетки [3]. Можно предположить, что каллоза участвует в защите здоровых клеток от перекиси водорода при ржавчинных болезнях.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в растениях *T. timopheevii* синтез каллозы является частью комплекса защитных механизмов от бурой ржавчины. Установлена тесная взаимосвязь между накоплением перекиси водорода в тканях устойчивых растений и синтезом каллозы. Вероятно, растения *T. timopheevii* обладают дополнительными механизмами устойчивости, не связанными с накоплением АФК и каллозы. Полученная информация может быть использована для создания растений с длительной устойчивостью к ржавчинным болезням.

Список литературы

1. Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В. Пшеницы мира [Под ред. В. Ф. Дорофеева]. Л.: Изд-во Агропромиздат. – 1987. – 560 с.
2. Заботин А.И., Барышева Т.С. Исследование регуляции метаболизма каллозы в клетках высших растений *in vitro* // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 6. – С. 890-897.
3. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про /антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 126. – № 3. – С. 250–261.

4. Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm. // Микология и фитопатология. – 1970. –Т. 4. – С. 269-273.
5. Плотникова Л.Я., Мешкова Л.В. Эволюция цитофизиологических взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы при преодолении устойчивости, детерминированной геном Lr19 // Микология и фитопатология – 2009. – Т. 43. – Вып. 4. – С.63.
6. Плотникова Л.Я., Пожерукова В.Е., Мешкова Л.В. Устойчивость пшеницы Тимофеева к *Puccinia triticina* в Западной Сибири // Микология и фитопатология. – 2015. – Т. 49. – Вып. 2. – С.116-125.
7. Пожерукова В.Е., Плотникова Л.Я., Дегтярев А.И. Устойчивость пшеницы Тимофеева к бурой ржавчине определяется генерацией активных форм кислорода и подавлением образования гаусторий гриба *Puccinia triticina* // Фундаментальные исследования. – 2015. – №2. – Ч. 2. – С. 285-292.
8. Heath M.C. Plant resistance to fungi // Can. J. Bot. – 1996. – Vol. 18. – P. 469-475.
9. Heath M.C. Involvement of Reactive Oxygen Species in the Response of Resistant (Hypersensitive) or Susceptible Cowpeas to the Cowpea Rust Fungus // New Phytol. – 1998. – Vol. 138. – P. 251-263.
10. Mains E.B., Jackson E.S. Physiological Specialization in the Leaf Rust Wheat *Puccinia triticina* Erikss. // Phytopathology. – 1926. – Vol. 16. – P. 89-120.

Рецензенты:

Барайщук Г.В., д.б.н., профессор кафедры садоводства, лесного хозяйства и защиты растений ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, г. Омск;

Баженова О.П., д.б.н., профессор кафедры экологии, природопользования и биологии ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, г. Омск.