

УДК 632.3;579.64

DOI 10.17721/1728\_2748.2021.84.61–66

А. Пастощук, асп., М. Коваленко, асист., Л. Сківка, д-р біол. наук, проф.  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## АНТИОКСИДАНТНІ РЕАКЦІЇ ПРОРОСТКІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ВПЛИВУ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* ТА ЇХНІХ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *IN VITRO*

*Pseudomonas syringae* є найпоширенішою фітопатогенною бактерією з великою кількістю рослин-мішеней, до яких входять важливі зернові культури, зокрема пшениця. Одним з основних збудників бактеріальних хвороб пшениці є *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. У деяких країнах втрати врожаю пшениці, спричинені цією фітопатогенною бактерією, сягають 50 %. Таксономія *P. Syringae* включає нині більше 50 патоварів із різним ступенем адаптації до ураження пшениці. Одним із таких патоварів є *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. *P. syringae* pv. *coronafaciens* не є адаптованим патогеном для пшениці. Однак ураження цим патогеном багатьох сільськогосподарських культур, зокрема пшениці, привертає увагу дослідників і фахівців агропромислового комплексу. Дослідження механізмів стійкості пшениці до ураження адаптованими та неадаптованими патоварами *P. syringae* представляє значний інтерес, як з погляду поглибленого вивчення збудника, так і в перспективі селекції стійких до бактеріальних хвороб сортів цієї стратегічно важливої для України зернової культури. Метою роботи стало порівняльне оцінювання антиоксидантних реакцій проростків пшениці різних сортів за умов обробки зернівок фітопатогенними бактеріями *P. Syringae* різних патоварів та їхніми ліпополісахаридами. Установлено, що генерація АФК, як механізм імунного захисту рослини проти фітопатогенних псевдомонад, однаковою мірою активується у випадку експозиції адаптованим і неадаптованим патогеном і меншою мірою – у випадку обробки ЛПС обох патогенів. Обробка зернівок чутливого до фітопатогенних псевдомонад сорту Фаворитка адаптованим патоваром спричиняє різку активацію ферментів антиоксидантного захисту, експозиція неадаптованим патоваром – різке накопичення проліну. Таким чином, чутливість проростків пшениці до фітопатогенних адаптованих і неадаптованих псевдомонад значною мірою залежить від збалансованого функціонування системи антиоксидантного захисту. У сукупності ці дані засвідчують перспективність окисливого метаболізму клітин пшениці як мішені для селекції сортів, стійких до фітопатогенних бактерій.

**Ключові слова:** *Pseudomonas syringae*, пшениця, антиоксидантна система.

**Вступ.** У літературі описано понад 200 видів бактерій, які здатні уражувати рослини [1]. Ці бактерії належать до 32 родів. Серед видів фітопатогенних бактерій найбільш розповсюдженими та шкідливими є представники роду *Pseudomonas*, зокрема вид *P. syringae*, до якого нині віднесено більше, ніж 50 патоварів [2]. На зернових культурах паразитують такі патовари: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (збудник базального бактеріозу), *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* (збудник ореольного опіку), *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (збудник бактеріального опіку), які зменшують урожай на 40 %, а в роки епіфітотії – більш, ніж на 70 % [3]. Одним з основних збудників бактеріальних хвороб пшениці є *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. У деяких країнах втрати врожаю пшениці, спричинені цією фітопатогенною бактерією, сягають 50 % [4]. *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* – один з найменш досліджених збудників бактеріозів зернових культур – згідно з літературними даними останніх років пропонується класифікувати як новий вид фітопатогенних псевдомонад *Pseudomonas coronafaciens*, спектр рослин-хазяїв якого, зокрема й серед таких стратегічних сільськогосподарських культур, як пшениця, потребує оновленого поглибленого вивчення [5].

Контакт рослини з фітопатогенною бактерією спричиняє активацію захисних імунних реакцій. Захист рослини від патогенних мікроорганізмів включає три лінії: фізичні бар'єри, імунні реакції, індуковані молекулярними патернами (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) патогенів, такими як ліпополісахарид (ЛПС), флагелін тощо (PAMP-triggered immunity, PTI), та імунні реакції, індуковані ефекторними білками патогенів (effector-triggered immunity, ETI). Розвиток цих реакцій відбувається не послідовно, а одночасно і паралельно із залученням багатьох спільних транскрипційних факторів та ефекторних молекул [6, 7]. Алгоритм розвитку захисних реакцій рослини залежить від багатьох зовнішніх чинників, таких як абіотичні стресори (осмотичний, температурний тощо), та природи патогенного організму: адаптований до рослини-хазяїна (hostpathogen, HP) або неадаптований (non-hostpathogen, NHP). Особливий інтерес для вивчення викликає формування стійкості рослини до неадаптованих або "нехазяйських" патогенів (non-

hostresistance, NHR) порівняно зі стійкістю до адаптованих шкочинних мікроорганізмів (hostresistance, HR), як нова мішень для селекції стійких сортів сільськогосподарських культур. Селекція рослин для стійкості до хвороб має вирішальне значення для підтримки світового виробництва сільськогосподарських культур. Протягом десятиліть селекціонери та дослідники широко використовували гени стійкості рослин-господарів (R-гени) для розвитку стійких до хвороб сортів. Однак загальна нестабільність R-генів у культурних сортах під впливом різноманітних популяцій патогенів зумовлює необхідність пошуку стабільніших засобів стійкості. Як альтернатива, стійкість до "нехазяйських" патогенів визнана найдовговічнішою формою стійкості до широкого спектра потенційних патогенів у рослинах [8, 9].

Як у випадку HR, так і у випадку NHR каскад захисних реакцій після розпізнавання PAMP активує рецепторні кінази, генерацію активних форм кисню (АФК), приплив кальцію, активацію мітогенактивованих протеїніназ, активацію транскрипції генів ефекторних молекул тощо [10, 11]. АФК відіграють важливу роль сигнальних молекул у цих каскадах, а також мають потужний антибактеріальний потенціал. Проте, продуковані у великій кількості, вони здатні взаємодіяти з білками, ліпідами і ДНК, спричиняючи метаболічні розлади, деструкцію клітинних мембран і клітинну загибель. Захист рослини від деструктивної дії АФК забезпечують ферменти антиоксидантного захисту. Збалансована взаємодія АФК і системи антиоксидантного захисту є одним із важливих елементів NHR [12].

У попередніх дослідженнях ми виявили, що обробка зернівок різних сортів озимої пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції, внесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні, клітинами *Pseudomonas syringae* та їхніми ЛПС по-різному впливає на їхнє проростання та ріст кореня паростків [13]. Метою цієї роботи було порівняльне оцінювання антиоксидантних реакцій проростків пшениці різних сортів за умов обробки зернівок фітопатогенними бактеріями *Pseudomonas syringae* різних патоварів та їхніми ліпополісахаридами.

**Матеріали і методи досліджень.** У роботі досліджували фітотоксичну активність двох штамів фітопатогенних псевдомонад: *Pseudomonas syringae* pv. *atrophaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978: УКМ 8281 – виділений з уражених бактеріозом рослин жита; *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030 – виділений з уражених рослин вівса.

Штами отримано з колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАНУ. Для постановки дослідів використовували суспензію живих клітин збудника титром  $10^9$  КУО / мл і розчин ЛПС із концентрацією 5 мг/мл.

Для отримання препаратів ЛПС із клітин *P. syringae* бактерії культивували на картопляному агарі протягом 24 год при температурі 28 °С. Бактеріальну масу змивали 0,85% розчином NaCl й осаджували центрифугуванням (6000 g, 15 хв). ЛПС екстрагували із сирової бактеріальної маси двічі 0,85% розчином NaCl при постійному

перемішуванні на магнітній мішалці за температури 4 °С протягом 4–5 год. На кожні 10 г клітин використовували 100 мл розчину NaCl. Екстракти центрифугували (6000 g, 15 хв), діалізом дистильованою водою протягом доби і висушували ліофільно. Очищення водного 3 % розчину отриманих ліофільно висушених біополімерів проводили ультрацентрифугуванням протягом 4 годин при 100 000 g і температурі 4 °С. Повторно ліофільно висушений осад використовували як препарати ЛПС у подальших дослідях [14]. ЛПС *P. syringae* pv. *atrophaciens* УКМ В-1013, який було отримано нами для дослідження, мав хімічний склад, подібний до раніше досліджених ЛПС цього виду бактерій і містив 30 % вуглеводів, 28 % білків, 5 % нуклеїнових кислот та 2-кето-3-дезоксикетонів кислоту.

Для дослідження використовували 7-добові етиольовані проростки озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сортів Подолянка, Діскус, Фаворитка (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристика досліджуваних сортів пшениці

| Назва сорту | Реєстрація в Україні | Рекомендована зона вирощування | Країна походження | Зимостійкість | Посухостійкість | Стійкість до захворювань | Стійкість до <i>P. syringae</i> pv. <i>atrophaciens</i> (McCulloch) |
|-------------|----------------------|--------------------------------|-------------------|---------------|-----------------|--------------------------|---|
| Подолянка   | 2003                 | степ, лісостеп, полісся        | Україна           | висока        | висока          | середня                  | висока  |
| Діскус      | 2009                 | лісостеп                       | Німеччина         | висока        | висока          | висока                   | помірна   |
| Фаворитка   | 2005                 | степ, лісостеп, полісся        | Україна           | висока        | середня         | висока                   | низька  |

Зернівки пшениці промивали водогінною водою впродовж 15 хв, а потім стерильною дистильованою водою впродовж 15 хв із використанням орбітального струшування і розкладали у чашки Петрі на стерильний фільтрувальний папір по 20 зернівок. Відсутність на поверхні зернівок екзофітної мікробіоти контролювали висівом зразків дистильованої води на поживні середовища загального призначення. У кожному варіанті дослідів використовували не менше 60 зернівок пшениці. У чашки Петрі вносили відповідно до варіанта дослідів 5 мл води (контроль), 5 мл суспензії клітин або 5 мл розчину ЛПС *P. syringae* різних патоварів.

Рівень перекисного окиснення ліпідів визначали за накопиченням реакційноздатних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS) за методом Кумара та Ноулза [15] зі змінами. Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали методом Giannopolitis & Ries [16]. КАТ (КФ 1.11.1.6) визначали відповідно до методу, наведеного у роботі Aebi et al. [17]. Визначення вмісту білка проводили методом Бредфорда [18]. Вміст проліну у досліджуваних зразках визначали методом Bates et al. [19].

Одержані дані обробляли статистично за допомогою програми Microsoft Excel. Повторність усіх дослідів триразова, вірогідність різниці між середніми арифметичними значеннями показників визначали за критерієм Стюдента. Відмінності вважали вірогідними, якщо значення *P* було  $\leq 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Проведені нами дослідження показали, що рівень окисного стресу у проростках пшениці, оброблених фітопатогенними бактеріями та їхніми ЛПС залежав від природи тригерного чинника (живі клітини чи ендотоксин), природи патогена (НР або

NHP) та сорту рослини (рис. 1). У всіх випадках обробка живими клітинами викликала виразніше посилення рівня TBARS, ніж обробка ЛПС. Це пояснюється полі- та монокомпонентною природою тригеру. У складі живих бактеріальних клітин, на додачу до ЛПС (монокомпонентного тригеру), присутня велика кількість молекулярних патернів, розпізнавання яких патерн-розпізнавальними структурами рослинних клітин здатне спричинити генерацію АФК [20]. Оксидативний стрес, викликаний NHP, було порівняно з таким, що спричинений обробкою адаптованим патогеном, незважаючи на існування механізмів інгібіторного впливу адаптованих патогенів на імунну реактивність рослини, у т. ч. *Pseudomonas syringae* pv. *atrophaciens*, для якого властива низка механізмів гальмування проявів захисних реакцій рослини-хазяїна [11].

Найменший прояв оксидативного стресу зареєстровано у сорту пшениці з мінімальною чутливістю до фітопатогенних псевдомонад (Подолянка): статистично вірогідна різниця між концентрацією TBARS у дослідних і контрольних зразках рослинного матеріалу була відсутня. Найвищі показники оксидативного стресу спостерігалися у найчутливішого сорту Фаворитка з максимальним проявом за умов обробки живими клітинами фітопатогенних бактерій (концентрація TBARS, у середньому, в 1,7 рази перевищувала таку у контрольних зразках). Отримані результати узгоджуються з літературними даними щодо характеру паразитизму фітопатогенних псевдомонад. *Pseudomonas syringae* найчастіше характеризується як гемібіотрофний патоген. АФК сприяють поширенню такого патогена, викликаючи некротичну загибель клітин і прискорення розвитку симптомокомплексу в ураженій рослині [21, 22].

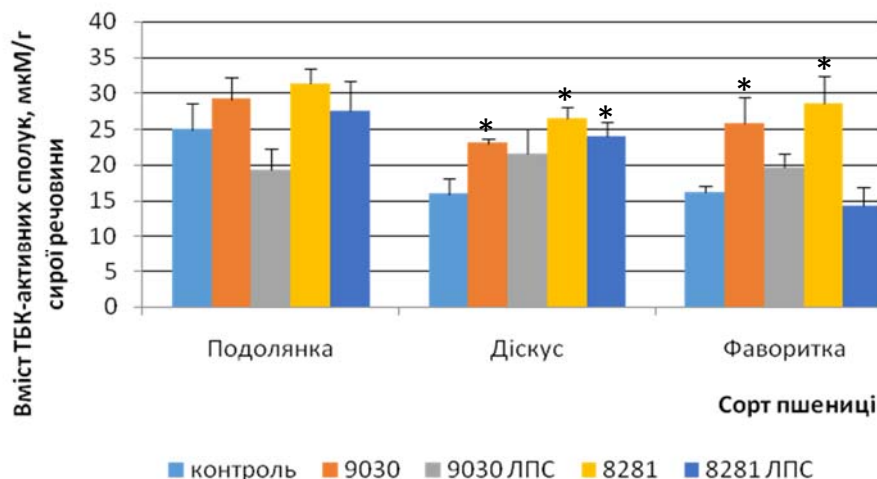


Рис. 1. Перекисне окиснення ліпідів у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітка: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978: УКМ 8281; \*  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.

Цитотоксична дія АФК в умовах впливу патогенних мікроорганізмів балансується системою ензимів антиоксидантного захисту, важливими компонентами якого є СОД та КАТ. СОД каталізує дисмутацію супероксидних аніон-радикалів до молекулярного кисню та пероксиду водню. Супероксидні радикали є джерелом утворення інших, зокрема й більш реакційноздатних АФК (пероксиду водню, пероксинітриту, гідроксильних, гідроксиперексидних радикалів, синглетного кисню). Оскільки специфічних ферментів для детоксикації пероксинітриту, гідроксильних радикалів і синглетного кисню не існує (завдяки здатності цих сполук активно окиснювати білкові молекули), виключна роль СОД в антиоксидантному захисті полягає у запобіганні їхньому утворенню [23]. Партнерським ензимом СОД у системі антиоксидантного захисту є КАТ, яка конвертує цитотоксичний пероксид водню, генерований за дії СОД, на воду. Зниження активності КАТ може супроводжуватися накопиченням пероксиду водню і посиленням його цитотоксичної дії [24]. Активність ензимів антиоксидантного захисту за умов обробки зернівок пшениці фітопатогенними псевдомонадами та їхніми ендотоксинами також значно варіювала

залежно від тригерного чинника, природи патогена та сорту пшениці. У тканинах проростків найстійкішого до патогена сорту Подільянка зареєстровано підвищення активності СОД за умов обробки клітинами обох патогенів та ЛПС адаптованого патогена (рис. 2). Обробка ЛПС неадаптованого патогена супроводжувалася зниженням активності цього ферменту. Причому вірогідного підвищення активності КАТ не зареєстровано у тканинах проростків цього сорту в жодному варіанті дослідження. Для сорту з помірною стійкістю до патогена Діскус спостерігалось вірогідне підвищення активності СОД лише за обробки ЛПС обох патогенів, активність КАТ була вищою за контрольні значення у всіх варіантах дослідження. У тканинах найчутливішого сорту Фаворитка статистично вірогідне підвищення активності СОД і найвищий показник активності КАТ зареєстровано лише у відповідь на обробку ЛПС неадаптованого патогена. Можна припустити, що однією з причин високої чутливості тканин проростків цього сорту є недостатньо ефективне функціонування системи антиоксидантного захисту.

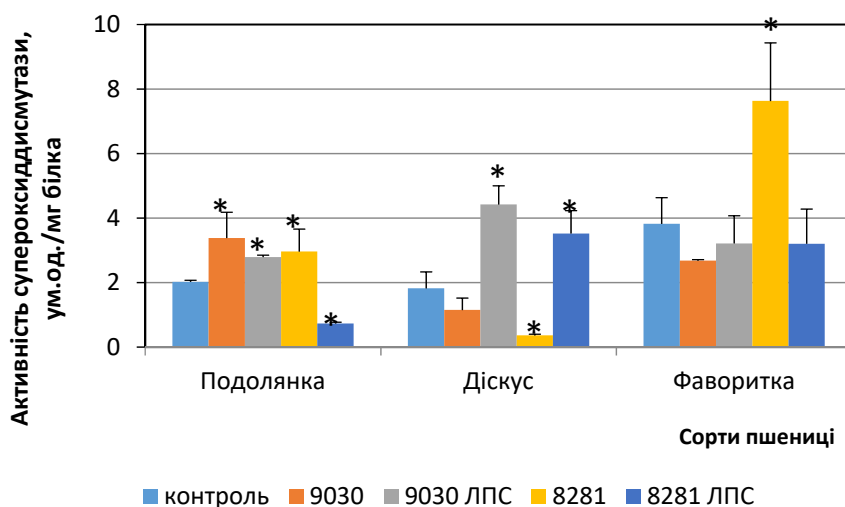


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітка: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978: УКМ 8281; \*  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.

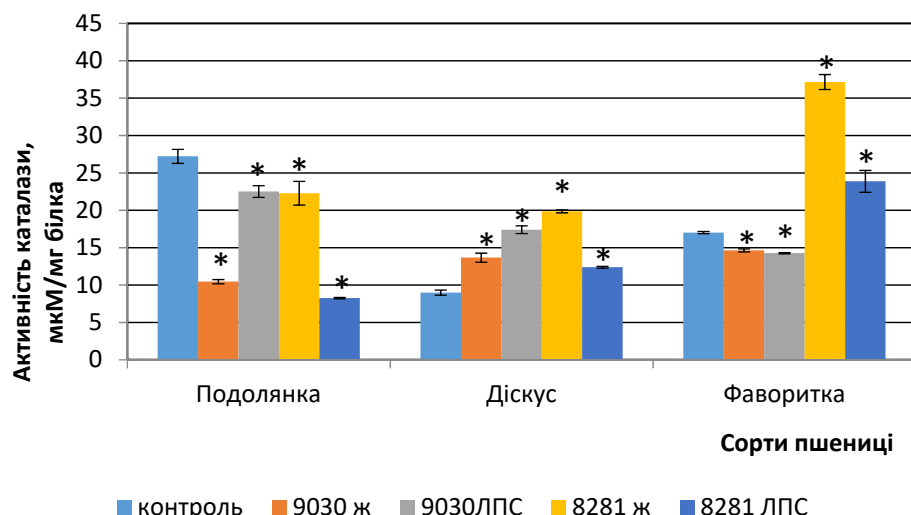


Рис. 3. Активність каталази у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітку: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978: УКМ 8281; \*  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.

Додатково до оцінювання активності ферментів антиоксидантного захисту у роботі досліджували концентрацію проліну. Пролін є протеогенною амінокислотою і накопичується у рослинних тканинах як у стресових, так і в нестресових умовах. Недавні відкриття вказують на те, що пролін відіграє важливу роль у рості та диференціації рослин протягом їхнього життєвого циклу. Пролін є ключовим компонентом регулятором рослинного метаболізму в умовах осмотичного стресу [25]. Останнім часом у літературі з'являються дані щодо участі проліну у захисті рослин від патогенів і регуляції редокс-потенціалу клітин. З одного боку, накопичення проліну у рослинній тканині може слугувати для нейтралізації АФК [26]. З іншого боку, накопичення проліну спричиняє інтенсифікацію його окиснення проліндегідрогеназою з утворенням

АФК [27]. За результатами наших досліджень найістотніше накопичення проліну у тканинах проростків пшениці всіх сортів спостерігалось у випадку обробки живими клітинами неадаптованого патогена (рис. 4), що узгоджується з літературними даними, згідно з якими взаємодія рослини з НР і ННР по-різному впливає на синтез і катаболізм проліну. У досліді на модельній рослині *Arabidopsis* показано, що взаємодія з НР і розвиток інфекційного процесу супроводжуються зниженням вмісту проліну і посиленням експресії проліндегідрогенази та 1-пірролін-5-карбоксилатдегідрогенази. Натомість, обробка ННР, яка зазвичай не викликає розвитку захворювання за рахунок успішного знешкодження мікроорганізму чинниками імунного захисту рослини, спричиняє накопичення проліну з активацією експресії лише 1-пірролін-5-карбоксилатдегідрогенази [28, 29].

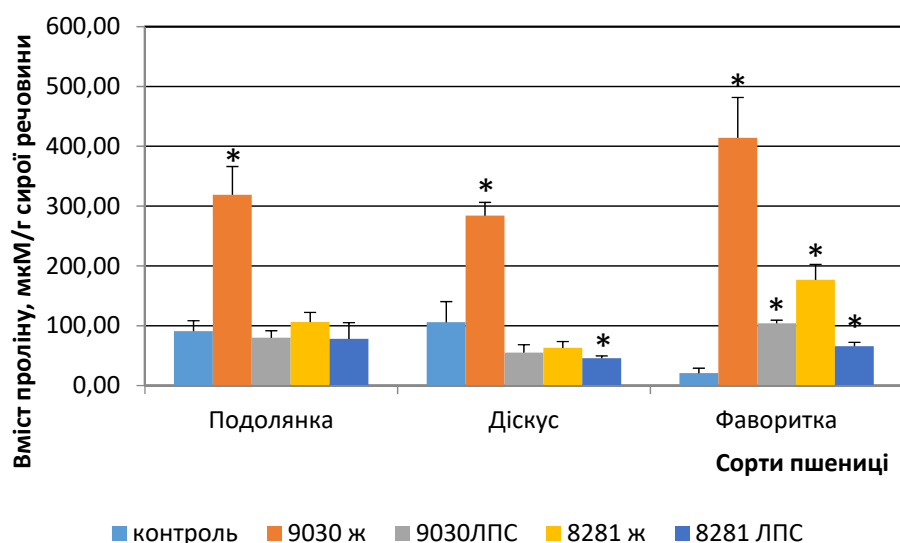


Рис. 4. Вміст вільного проліну у тканинах проростків пшениці різних сортів за умов обробки фітопатогенними бактеріями та їхніми ліпополісахаридами

Примітку: 9030 – *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ 9030; 8281 – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye&Wilkie 1978: УКМ 8281; \*  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.

Також зазначимо, що лише у тканинах проростків пшениці найчутливішого до патогена сорту зареєстровано найнижчий рівень проліну у контролі і статистично вірогідне накопичення проліну в усіх варіантах досліду з максимальними значеннями за умов обробки живими клітинами обох патоварів, що найбільшою мірою викликала перекисне окиснення ліпідів у рослинних тканинах. Це дає підставу припустити, що особливості метаболізму проліну можуть бути ще однією із причин підвищеної чутливості сорту Фаворитка до шкодочинної дії фітопатогенних псевдомонад, зокрема й за рахунок додаткової генерації цитотоксичних АФК.

**Висновок.** Генерація АФК як механізм імунного захисту рослини проти фітопатогенних псевдомонад однаковою мірою активується у випадку експозиції як адаптованим, так і неадаптованим патогеном, і меншою мірою – у випадку обробки ЛПС обох патогенів. Обробка зернівки чутливого до фітопатогенних псевдомонад сорту Фаворитка адаптованим патоваром спричиняє різку активацію ферментів антиоксидантного захисту, експозиція неадаптованим патоваром – різке накопичення проліну. Таким чином, чутливість проростків пшениці до фітопатогенних адаптованих і неадаптованих псевдомонад значною мірою залежить від збалансованого функціонування системи антиоксидантного захисту. У сукупності ці дані засвідчують перспективність оксидативного метаболізму клітин пшениці як мішені для селекції сортів, стійких до фітопатогенних бактерій.

#### Список використаної літератури

- Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants: Monograph / R. I. Gvozdyak, L. A. Pasichnyk, L. M. Yakovleva et al. // K.: "RPE Interservis" Ltd. – 2011. – 58 p. In Ukrainian.
- Xin X. F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X. F. Xin, B. Kvito, S. Y. He // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – 16(5). – 316.
- Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread / L. A. Pasichnik, V. F. Patyka, S. F. Khodos, T. S. Vinnichuk // *Mikrobiol. Zhur.* – 2012. – 74(4). – P. 37–44.
- Valencia-Boti'n A. J. Are view of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat / Valencia-Boti'n A. J., Cisneros-Lo'pez N.E. // *Int. J. Agron.* – 2012. – 2012:692350.
- Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae* / B. Dutta, R. Gitaitis, G. Agarwal et al. // *PloSone*. – 2018. – Vol. 13. – № 12. – e0208271.
- Pai Li. The Life cycle of the Plant Immune System // Li Pai, Lu Yi-Ju, Huan Chen & Brad Day Critical // *Reviews in Plant Sciences*. – 2020; 39:1: 72-100.
- Saijo Y. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses / Y. Saijo, E. P. Loo // *New Phytol.* – 2020. – Vol. 225. – № 1. – P. 87–104.
- Delventhal R. A comparative analysis of nonhost resistance across the two Triticeae crop species wheat and barley / R. Delventhal, J. Rajaraman, F. Stefanato et al. // *BMC Plant Biol.* – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 232.
- Li W. Exploiting Broad-Spectrum Disease Resistance in Crops: From Molecular Dissection to Breeding / W. Li, Y. Deng, Y. Ning, Z. He, G. L. Wang // *Annu Rev Plant Biol.* – 2020. – 71. – P. 575–603.
- From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition / X. Yu, B. Feng, P. He, L. Shan // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2017. – 55. – P. 109–137.
- Phevarmine A, a small molecule that suppresses plant immune responses / E. M. O'Neill, T. S. Mucyn, J. B. Patteson et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2018. – Vol. 115. – № 41. – e9514-E9522.
- Li L. Plant immune responses – from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens / L. Li, A. C. Harmon, S. Chen // *Plant Signal Behav.* – 2019. – Vol. 14. – № 5. – e1588667.
- Effect of causal agent of basal bacteriosis on seed germination and root growth of different wheat varieties / A. Yu. Pastoshchuk, L. M. Skivka, L. M. Butsenko, V. P. Patyka // *Microbiology & Biotechnology*. – 2018. – Vol. 2. – № 42. – P. 39–48.
- Zdorovenko G. M. *Pseudomonas syringae* lipopolysaccharides: Immuno chemical characteristics and structures as a basis for strain classification / G. M. Zdorovenko, E. L. Zdorovenko // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 79. – P. 47–57.
- Kumar G. N. M. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radicals scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers / G. N. M. Kumar, N. R. Knowles // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 102. – P. 115–124.
- Giannopolitis C. N. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants / C. N. Giannopolitis, S. K. Ries // *Plant Physiol.* – 1977. – Vol. 59. – P. 309–314.
- Aeby H. Catalase invitro / H. Aeby // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 105. – P. 121–126.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
- Bates L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L. S. Bates, R. P. Waldren, I. D. Teare // *Plant Soil*. – 1973. – Vol. 39. – P. 205–207.
- Abdul Malik N. A. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity / N. A. Abdul Malik, I. S. Kumar, K. Nadarajah // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 963.
- Lindeberg M. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments / M. Lindeberg, S. Cunnac, A. Collmer // *Trends Microbiol.* – 2012. – Vol. 20. – N4. – P. 199–208.
- Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum / M. T. Hulin, J. W. Mansfield, P. Brain et al. // *Plant Pathol.* – 2018. – Vol. 67. – № 5. – P. 1177–1193.
- Baranenko V. V. Superoxide dismutase in plant cells / V. V. Baranenko // *Tsitologiya*. – 2006. – Vol. 48. – № 6. – P. 465–474.
- Nowogórska A. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection / A. Nowogórska, J. Patkowski // *Acta Physiol. Plant*. – 2015. – Vol. 37. – P. 1725.
- Kavi P.B. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny / Kavi P.B., Hima Kumari P., Sunita M.S., Sreenivasulu N. // *Front. Plant Sci.* – 2015. – V.6. – 544.
- Meena M. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions / M. Meena, K. Divyanshu, S. Kumar et al. // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5. – № 12. – e02952.
- Zeier J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways / J. Zeier // *Plant Cell Environ.* – 2013. – Vol. 36. – № 12. – P. 2085–2103.
- Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis / G. Fabro, I. Kovács, V. Pavet et al. // *Molecular Plant-microbe Interactions. MPMI*. – 2004. – Vol. 17. – № 4. – P. 343–350.
- The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation / K. Deuschle, D. Funck, G. Forlani et al. // *Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – № 12. – 3413–3425.

#### Reference (Scopus)

- Gvozdyak R.I., Pasichnyk L.A., Yakovleva L. M. Et al. Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants: Monograph. – K.: "RPE Interservis" Ltd. – 2011. 58 p. In Ukrainian.
- Xin, X. F., Kvito, B., & He, S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 2018; 16(5): 316.
- Pasichnik L.A., Patyka V.F., Khodos S.F., Vinnichuk T.S. Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread. *Mikrobiol. Zhur.* 2012; 74(4): 37–44.
- Valencia-Boti'n A.J., Cisneros-Lo'pez N.E. Are view of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *Int. J. Agron.* 2012; 2012:692350.
- Dutta B., Gitaitis R., Agarwal G., Coutinho T., Langston D. *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae*. *PloSone*. 2018;13(12):e0208271.
- Pai Li, Yi-Ju Lu, Huan Chen & Brad Day The Life cycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2020; 39:1:72-100.
- Saijo Y, Loo P. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol.* 2020;225(1):87-104.
- Delventhal R., Rajaraman J., Stefanato L., Rehman S., Aghnoum R., McGrann G., Bolger M., Usadel B., Hedley P., Boyd L., Niks R., Schweizer P., Schaffrath U. A comparative analysis of non host resistance across the two Triticeae crop species wheat and barley. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):232.
- Li W., Deng Y., Ning Y., He Z., Wang G.L. Exploiting Broad-Spectrum Disease Resistance in Crops: From Molecular Dissection to Breeding. *Annu Rev Plant Biol.* 2020;71:575-603.
- Yu X., Feng B., He P., Shan L. From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2017; 55:109–137.
- O'Neill E.M., Mucyn T.S., Patteson J.B., Finkel O.M., Chung E.H., Baccile J.A., Massolo E., Schroeder F.C., Dangl J.L., Li B. Phevarmine A, a small molecule that suppresses plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(41):E9514-E9522.
- Li L., Harmon A., Chen S. Plant immune responses – from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. *Plant Signal Behav.* 2019;14(5):e1588667.
- Pastoshchuk A.Yu., Skivka L.M., Butsenko L.M., Patyka V.P. Effect of causal agent of basal bacteriosis on seed germination and root growth of different wheat varieties. *Microbiology & Biotechnology*. 2018. 2(42):39–48.
- Zdorovenko G., Zdorovenko E. *Pseudomonas syringae* lipopolysaccharides: Immuno chemical characteristics and structures as a basis for strain classification. *Microbiology*. 2010. 79: 47–57.
- Kumar G., Knowles N. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radicals scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol.* 1993; 102:115–24.
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977; 59:309–14.
- Aeby H. Catalase invitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.

18. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
19. Bates L.S., Waldren R.P. & Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 1973; 39: 205–207.
20. Abdul Malik N.A., Kumar I.S., Nadarajah K. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):963.
21. Lindeberg M., Cunnac S., Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol.* 2012;20(4):199-208.
22. Hulin M., Mansfield J.W., Brain P., Xu X., Jackson R.W., Harrison R. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathol.* 2018;67(5):1177-1193.
23. Baranenko V. [Superoxidedismutase in plant cells]. *Tsitologiya.* 2006;48(6):465-74.
24. Nowogórska A., Patykowski J. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection. *Acta Physiol Plant.* 2015; 37, 1725.
25. Kavi Kishor P., Hima Kumari P., Sunita M., Sreenivasulu N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front Plant Sci.* 2015;6:544.

26. Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., Zehra A., Shukla V., Yadav M., Upadhyay R. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon.* 2019;5(12):e02952.
27. Zeier J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ.* 2013;36(12):2085-103.
28. Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-microbe Interactions* : MPML. 2004;17(4):343-350.
29. Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunze R., Frommer W.B. The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell.* 2004;16(12):3413-25.

Надійшла до редколегії 06.01.2021  
Отримано виправлений варіант 03.01.2021  
Підписано до друку 03.01.2021

Received in the editorial 06.01.2021  
Received a revised version on 03.01.2021  
Signed in the press on 03.01.2021

А. Пастощук, асп., М. Коваленко, ассист., Л. Скивка, д-р биол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

### АНТИОКСИДАНТНЫЕ РЕАКЦИИ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗНЫХ СОРТОВ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВЛИЯНИЮ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* И ИХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *IN VITRO*

*Pseudomonas syringae* является самой распространенной фитопатогенной бактерией с широким кругом растений-мишеней, в число которых входят важные зерновые культуры, в т. ч. пшеница. Одним из основных возбудителей бактериальных болезней пшеницы является *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. В некоторых странах потери урожая пшеницы, вызванные этой фитопатогенной бактерией, достигают 50 %. Таксономия *P. syringae* включает на сегодняшний день более 50 патоваров с разной степенью адаптации к поражению пшеницы. Одним из таких патоваров является *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. *P. syringae* pv. *coronafaciens* не является адаптированным патогеном для пшеницы. Однако, поражение этим патогеном широкого круга сельскохозяйственных культур, в т. ч. и пшеницы, привлекает внимание как исследователей, так и специалистов агропромышленного комплекса. Исследование механизмов устойчивости пшеницы к поражению адаптированными и неадаптированными патоварами *P. syringae* представляет значительный интерес и с точки зрения углубленного изучения возбудителя, и в перспективе селекции устойчивых к бактериальным болезням сортов этой стратегически важной для Украины зерновой культуры. Целью работы была сравнительная оценка антиоксидантных реакций проростков пшеницы различных сортов в условиях обработки зерновок фитопатогенными бактериями *P. syringae* различных патоваров и их липополисахаридами (ЛПС). Установлено, что генерация АФК, как механизм иммунной защиты растения против фитопатогенных псевдомонад, в равной степени активируется в случае экспозиции как адаптированным, так и неадаптированным патогеном и в меньшей степени – в случае обработки ЛПС обоих патогенов. Обработка зерновок чувствительного к фитопатогенным псевдомонадам сорта Фаворитка адаптированным патоваром вызывает резкую активацию ферментов антиоксидантной защиты, экспозиция неадаптированным патоваром – резкое накопление пролина. Таким образом, чувствительность проростков пшеницы у фитопатогенных адаптированных и неадаптированных псевдомонад в значительной степени зависит от сбалансированного функционирования системы антиоксидантной защиты. В совокупности эти данные свидетельствуют о перспективности окислительного метаболизма клеток пшеницы как мишени для селекции сортов, устойчивых к фитопатогенным бактериям.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, пшеница, антиоксидантная система.

A. Pastoschuk, PhD Student, M. Kovalenko, Assist., L. Skivka, Dr Hab.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

### ANTIOXIDANT REACTIONS IN WINTER WHEAT SEEDLINGS OF DIFFERENT CULTIVARS, EXPOSED TO THE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* AND ITS LIPOPOLYSACCHARIDES *IN VITRO*

*Pseudomonas syringae* is the most common phytopathogenic bacterium with a wide range of target plants, which include important cereals such as wheat. One of the main pathogens of bacterial diseases of wheat is *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. In some countries, wheat yield losses caused by this phytopathogenic bacterium reach 50%. Currently, the taxonomy of *P. syringae* includes more than 50 pathovars with varying degrees of adaptation to wheat lesions. One of them is *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. *P. syringae* pv. *Coronafaciens* is non-host pathogen for wheat. However, the infection of a wide range of crops, including wheat, with this pathogen attracts the attention of both researchers and specialists of the agro-industrial complex. The study of the mechanisms of wheat resistance to host and non-host pathovars of *P. syringae* is of great interest, both in terms of in-depth study of the pathogen and in the perspective of selection of bacterial disease-resistant varieties of this strategically important grain crop for Ukraine. The aim of the study was to compare the antioxidant reactions of wheat seedlings of different winter wheat varieties under the grain exposition to *P. syringae* of different pathovars and their lipopolysaccharides (LPS). It was found that reactive oxygen species generation, as a mechanism of plant immune protection against phytopathogenic pseudomonads, is equally activated in the case of exposure to both host and non-host pathovars and to a lesser extent in the case of the exposure with LPS of both pathovars. In grains of Favoritka variety (most sensitive to phytopathogenic pseudomonads) exposed to host pathovar, significant activation of antioxidant enzymes was observed. Exposure to the non-host pathovar causes sharp proline accumulation. Thus, the sensitivity of wheat seedlings to phytopathogenic host and non-host pathovars of phytopathogenic pseudomonads largely depends on the balanced functioning of the antioxidant defense system. Taken together, these data indicate the wheat cell oxidative metabolism as a target for selection of varieties resistant to phytopathogenic bacteria.

Keywords: *Pseudomonas syringae*, wheat, antioxidant system.