

УДК 581.1

## РЕАКЦІЯ ЛИСТКІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ НА РОЗВИТОК УРАЖЕННЯ БОРОШНИСТОЮ РОСОЮ

Т.П. МАМЕНКО, О.А. ЯРОШЕНКО

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: t\_tamenko@ukr.net*

Показано, що в листках рослин пшениці стійкого сорту Фаворитка розвиток ураження борошнистою росою супроводжувався значною інтенсифікацією активності супероксиддисмутази, зменшенням вмісту пероксиду водню та збільшенням утворення етилену. При цьому на другу добу ураження активність антиоксидантних ферментів, а також вміст пероксиду водню були значно вищими, ніж у листках сприйнятливої сорту Поліська 90. Це свідчить, що вже на початкових етапах ураження в листках пшениці стійкого сорту захисні системи активуються значно швидше та ефективніше, що в подальшому обмежує розвиток хвороби.

*Ключові слова:* *Triticum aestivum* L., супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, каталаза, пероксид водню, етилен, фенілаланінаміакліаза, *Erysiphe graminis* DC. f.sp. *tritici* Em. Marchal.

Виробництво зерна озимої пшениці є одним зі стратегічних напрямів зміцнення економіки України, однак потенціал урожайності цієї культури не реалізується повною мірою у зв'язку з ураженням посівів фітопатогенами й пошкодженням шкідниками [4, 8]. Реалізація потенційної продуктивності озимої м'якої пшениці часто обмежується розвитком фітозахворювань, серед яких найшкідливішими є септоріозна плямистість листків, борошниста роса, бура листкова іржа та сажкові хвороби [3, 8].

Борошниста роса пшениці — одна з найбільш шкодочинних хвороб цієї культури, яка може призводити до значного зниження врожаю та його якості в різних регіонах країни. Збудником борошнистої роси є сумчастий гриб *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal, що належить до облігатних, вузькоспеціалізованих паразитів. Уражує посіви протягом усього періоду вегетації, починаючи з осені, максимально розвивається у фазу цвітіння зернових. Недобір урожаю від ураження борошнистою росою становить 10—15 %, за сприятливих для розвитку хвороби умов може досягати 50 % [7].

Існує два шляхи вирішення проблеми борошнистої роси: вирощування стійких сортів і захист посівів за допомогою обприскування фунгіцидами [1]. Хімічний метод захисту має недолік — виникають раси збудника, стійкі до фунгіцидів. Зокрема вже встановлено резистентність борошнистої роси до фунгіцидів класів триазолів, імідазолів, морфолінів, спірокеталамінів, стробілуринів, квінолінів [1].

Створення стійких сортів — визнаний у всьому світі найефективніший, економічно обґрунтований і досконалий з погляду охорони

навколишнього середовища метод захисту рослин [9]. Успішний розвиток селекційної роботи в цьому напрямі неможливий без використання генофонду стійких форм. Останнім часом на фоні подорожчання фунгіцидних препаратів, з одного боку, та екологічної кризи біосфери — з іншого, особливого значення набуває пошук нових ефективних джерел стійкості до хвороб [4, 5].

В останні роки вчені акцентують увагу на молекулярно-генетичних дослідженнях природної стійкості рослин до стресів. Інтенсивно ведуться пошуки груп генів, відповідальних за стійкість до біотичних чинників [18]. Вважають, що вже на початкових етапах селекції з використанням методів молекулярної біології можна ідентифікувати стійкі генотипи [17, 18].

Аналіз сучасного районованого сортименту свідчить про наявність незначної кількості сортів, стійких до шкідливих організмів. Тому створення сортів, що поєднують високий потенціал урожайності зі стійкістю до хвороб і шкідників — одне з ключових питань селекції та найдосконаліший, екологічний і виправданий метод захисту культури від шкідливих організмів [4, 7].

Метою нашої роботи було вивчення реакції рослин контрастних за стійкістю сортів озимої пшениці на розвиток ураження борошністою росюю за зміною активності антиоксидантних процесів у листках і стрес-захисних реакцій.

### Методика

Об'єктами дослідження обрано сорти озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) — Фаворитка (стійкий до борошністої роси) і Поліська 90 (сприйнятливий до борошністої роси), які вирощували у вегетаційних посудинах Вагнера на темно-сірому опідзоленому ґрунті за оптимального водозабезпечення та природного освітлення. Ураження фітопатогеном *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal було природним у фазу колосіння—цвітіння. Ступінь ураження рослин хворобою обліковували за загальноприйнятою методикою [6].

Для досліджень відбирали прапорцеві листки озимої пшениці на 2-гу й 10-ту доби після початку розвитку хвороби.

Для визначення інтенсивності виділення етилену зразки рослинного матеріалу вміщували в скляні флакони місткістю 15 см<sup>3</sup>, герметично їх закривали і залишали в темряві на 24 год. Після інкубації газову суміш, яка містила етилен, аналізували на газовому хроматографі «Chromatograf-504» (Польща) з полуменево-іонізаційним детектором. Розділяли гази в колонці завдовжки 3 м і діаметром 3 мм, заповненій Porapak Q, за температури 30 °С. Газоносієм слугував гелій (25 мл/хв). Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 см<sup>3</sup>. Кількість утвореного етилену в досліджуваному зразку порівнювали із сертифікованим стандартом етилену («Fluca»), концентрація якого становила 10 мкл/л [13].

Вміст пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) визначали за кольоровою реакцією з роданідом калію спектрофотометрично за довжини хвилі 480 нм [20]. Концентрацію H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> встановлювали за допомогою калібрувального графіка, побудованого за відомими концентраціями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Результати наведено у мікромолях на 1 г сухої речовини.

Для визначення активності фенілаланінаміакліази (ФАЛ) рослинний матеріал (0,2 г) розтирали з 4 мл 0,2 М боратного буфера (рН 8,8), який містив 1 мМ ЕДТА, 5 мМ β-меркаптоетанолу і 1 % (m/V) полі-

вінілпіролідону. Гомогенат центрифугували за 12 000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Надосадову рідину використовували для визначення активності ФАЛ спектрофотометрично при 290 нм за утворенням *транс*-коричної кислоти в 0,1 М боратному буфері (рН 8,8) за наявності 50 мМ *L*-фенілаланіну. Інкубували реакційну суміш протягом 1 год за 40 °С [3].

Для отримання ферментного екстракту наважку рослинного матеріалу (0,2 г) розтирали у ступці з 4 мл охолодженого 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,5), який містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 5 мМ β-меркаптоетанолу й 1 % (*m/V*) полівінілпіролідону. Гомогенат центрифугували за 10 000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Надосадову рідину використовували для визначення активності ферментів.

Активність каталази (КАТ) знаходили за зменшенням оптичної густини при 240 нм протягом 2 хв унаслідок розкладання пероксиду водню (коефіцієнт екстинкції  $E = 39,4 \text{ (мМ} \cdot \text{см)}^{-1}$ ) [10]. Активність аскорбатпероксидази (АПО) обчислювали за зменшенням оптичної густини при 290 нм протягом 2 хв у результаті окиснення аскорбату (коефіцієнт екстинкції  $E = 2,8 \text{ (мМ} \cdot \text{см)}^{-1}$ ) [19]. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за здатністю ферменту інгібувати фотохімічне відновлення нітросинього тетразолію. Оптичну густину вимірювали при 560 нм. За одиницю активності СОД брали кількість ферменту, необхідну для інгібування фотовідновлення нітросинього тетразолію на 50 % [12].

Вміст сумарного розчинного білка у ферментному екстракті визначали за методикою Бредфорда [11]. Повторність визначень біохімічних показників — десятиразова. Отримані дані оброблено статистично з використанням критерію Стюдента.

## Результати та обговорення

Встановлено, що ураження озимої пшениці фітопатогеном на 2-гу добу було в 13 разів вищим у рослин сорту Поліська 90 порівняно із сортом Фаворитка (рис. 1). У міру розвитку хвороби на 10-ту добу ступінь ураження сортів *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal зростав і був у 6 разів вищим у сорту Поліська 90.

Розвиток хвороби в рослинах озимої пшениці сприйнятливого сорту Поліська 90 супроводжувався інтенсифікацією окиснювальних процесів, про що свідчило підвищення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  у листках на 26 % (на 10-ту добу ураження фітопатогеном) (рис. 2). Водночас у стійкого сорту Фаворитка вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  у листках знижувався на 29 % (10-та доба).

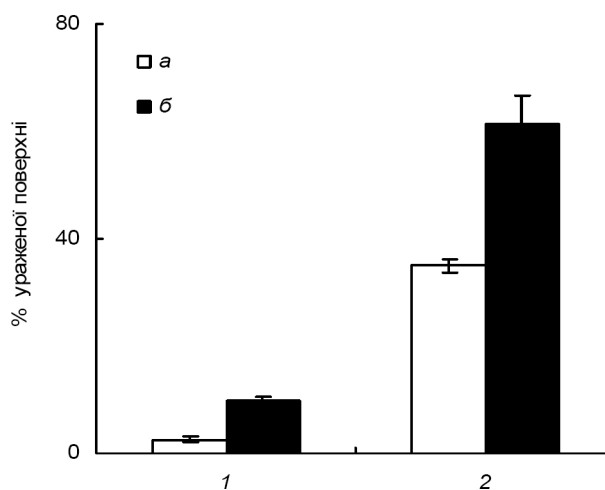


Рис. 1. Розвиток борошнистої роси у сортів озимої пшениці, контрастних за стійкістю до *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal. Тут і на рис. 2—4:

а — 2-га доба ураження; б — 10-та доба ураження; 1 — сорт Фаворитка; 2 — сорт Поліська 90

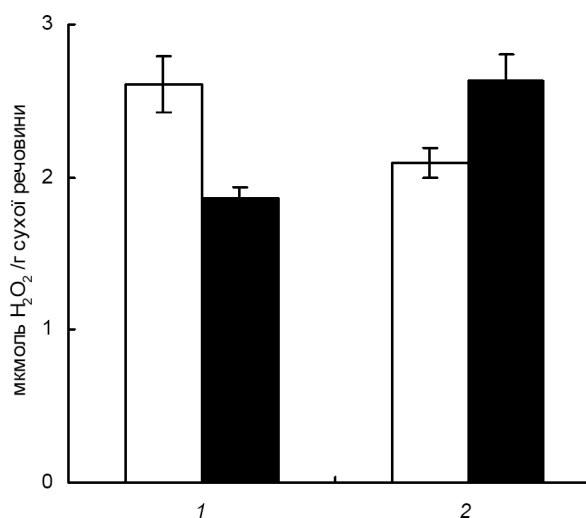


Рис. 2. Вплив ураження озимої пшениці *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal на вміст перексиду водню в її листках

Припускають, що інтенсифікація вільно-радикальних процесів і зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у клітині є однією з перших неспецифічних ланок у розвитку загальної стрес-реакції та важливою характеристикою її внутрішнього середовища, яка запускає інші механізми захисту [14, 16, 20]. До ключових ферментів захисту живих організмів від окиснювальної деструкції належить СОД, яка перетворює високоактивний  $O_2^{\cdot-}$  на менш актив-

ний продукт  $H_2O_2$  [12, 16].

Встановлено, що розвиток хвороби супроводжувався підвищенням активності СОД, особливо у листках рослин сорту Фаворитка, на 128 %, тоді як у сорту Поліська 90 — на 32 % (таблиця). Така інтенсифікація активності ферменту в уражених рослин стійкого сорту Фаворитка очевидно пов'язана з нейтралізацією шкідливої дії АФК.

Відомо, що СОД не забезпечує повного захисту клітини від окиснювального стресу, оскільки при її роботі утворюється  $H_2O_2$ . Тому ефективність СОД великою мірою визначається функціонуванням інших компонентів системи захисту, зокрема тих, що утилізують  $H_2O_2$  (каталаз, пероксидаз), і ферментів аскорбат-глутатіонового циклу [2, 16, 19].

Виявлено, що на 10-ту добу розвитку хвороби активність АПО в листках уражених рослин сприйнятливого сорту Поліська 90 підвищувалась на 170 %, у стійкого сорту Фаворитка — на 83 % (див. таблицю). За дії *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal на озиму пшеницю тенденція зміни активності КАТ у листках була подібною до зміни активності АПО. Зокрема зафіксовано зростання активності КАТ у листках уражених рослин озимої пшениці стійкого сорту на 24 %, у сприй-

Вплив ураження озимої пшениці *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal на зміни активності антиоксидантних ферментів у її листках

Період після ураження фітопатогеном	СОД, од. акт./ мг білка	АПО, мкмоль аскорбату/ (мг білка · хв)	КАТ, мкмоль $H_2O_2$ /(мг білка · хв)
Фаворитка			
2-га доба	255,1±14,0	2,4±0,2	0,111±0,007
10-та доба	581,5±40,7	4,4±0,3	0,138±0,010
Поліська 90			
2-га доба	467,0±32,7	1,7±0,1	0,030±0,002
10-та доба	614,8±43	4,6±0,3	0,053±0,003

нятливого сорту — на 76 % (див. таблицю). Отже, у сприйнятливо-го сорту озимої пшениці Поліська 90 АПО і КАТ за дії стресу активувались сильніше, хоча їх початковий рівень був нижчий, ніж у стійкого сорту Фаворитка.

Відомо, що  $H_2O_2$  індукує експресію певних генів, у тому числі гена ФАЛ. Вважають, що однією із захисних реакцій на дію стресорів різної природи є активування фенольного метаболізму, зокрема

синтезу ферменту, що каталізує першу і швидкістьлімітувальну реакцію фенілпропанового шляху (дезамінування фенілаланіну) — ФАЛ. Крім того, ФАЛ як ключовий фермент фенілпропанового шляху забезпечує утворення коричної кислоти, що є попередником для синтезу багатьох сполук, таких як феноли, фітоалексини, лігніноподібні полімери, які залучені в потовщення клітинної стінки, інших сполук, необхідних для захисту рослин [2, 15].

Виявлено, що на 10-ту добу розвитку хвороби активність ферменту ФАЛ у листках уражених рослин сорту Фаворитка знижувалась на 24 %, у сорту Поліська 90, навпаки, зростала на 17 % (рис. 3). Очевидно, що такі зміни активності ферменту пов'язані з внутрішньоклітинними перебудовами метаболізму рослин обох сортів у відповідь на дію стресу, однак ці зміни мали різноспрямований характер.

АФК, у тому числі й  $H_2O_2$ , функціонують як своєрідні сигнальні молекули в запуску каскаду захисних реакцій. Зокрема показано, що біосинтез етилену за дії стресорів абіотичної й біотичної природи стимулюється генеруванням АФК. Вважають, що утворення «стресорного» гормону етилену є однією з найшвидших реакцій

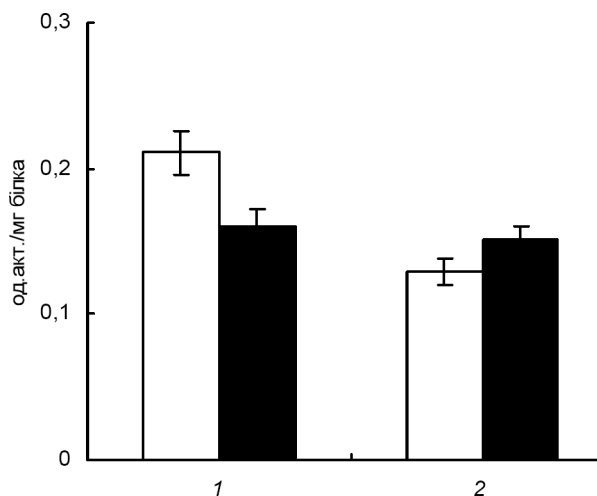


Рис. 3. Вплив ураження озимої пшениці *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal на зміни активності фенілаланінаміакліази в її листках

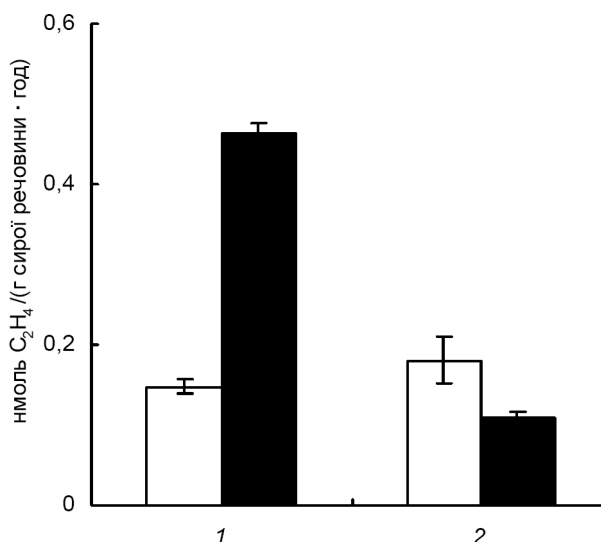


Рис. 4. Вплив ураження озимої пшениці *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal на інтенсивність виділення етилену з її листків

на зовнішній вплив, а його виділення реалізується лише за наявності кисню і свідчить про перехід клітинного метаболізму в стресовий стан і формування стрес-захисних механізмів [21].

Встановлено, що сорти озимої пшениці відрізнялися за рівнем синтезу етилену у відповідь на дію фітопатогену. Так, у міру розвитку хвороби на 10-ту добу в стійкого сорту виділення етилену стимулювалось до 200 %, у сприйнятливого — його синтез знижувався до 40 % (рис. 4). Очевидно, це пов'язано з адаптивним потенціалом сортів і здатністю до мобілізації власних захисних систем за дії стресу.

Таким чином, в листках рослин стійкого сорту Фаворитка розвиток ураження борошнистою росою супроводжувався значною інтенсифікацією активності СОД, зменшенням вмісту  $H_2O_2$  та збільшенням утворення етилену. При цьому на другу добу ураження активність АПО, КАТ і ФАЛ, а також вміст  $H_2O_2$  були значно вищими, ніж у листках сприйнятливого сорту Поліська 90. Листки останнього уражувались сильніше, що супроводжувалось збільшенням вмісту  $H_2O_2$  та зменшенням утворення етилену на 10-ту добу ураження. Це свідчить, що вже на початкових етапах ураження в листках стійкого сорту захисні системи активуються значно швидше й ефективніше, що в подальшому обмежує розвиток хвороби.

1. *Борошниста роса пшениці — проблема і рішення* // Бюл. компанії Дюпон. Зелені сторінки. — Червень 2009. — С. 6—7.
2. *Евтушенко Е.В., Сапрыкин В.А., Галицын М.Ю., Чекуров В.М.* Влияние биологически активных веществ на активность фенилаланин-аммоний-лиаза и пероксидазы в листьях пшеницы // Прикл. биохимия и микробиология. — 2008. — **44**, № 1. — С. 123—128.
3. *Зозуля О., Омеляненко О.* Комплексу хвороб — комплексні фунгіциди // Агробізнес сьогодні. — 2010. — № 6. — С. 16—17.
4. *Ковалишина Г.М., Муха Т.І., Мурашко Л.А. та ін.* Характеристика сортів пшениці озимої за стійкістю проти збудників хвороб та шкідників // Селекція та насінництво. — 2016. — № 1 (30). — С. 50—56.
5. *Моцний І.І., Благодарова О.М.* Успадкування стійкості до хвороб та морфологічних ознак у гібридів м'якої пшениці з інтрогресивними лініями // Зб. наук. праць СГП—НЦНС. — Одеса. — 2004. — Вип. 6 (46). — С. 179—193.
6. *Омелюта В.П., Григорович І.В., Чабан В.С. та ін.* Облік шкідників і хвороб сільськогосподарських культур. — К.: Урожай, 1986. — 296 с.
7. *Ретьман С.В., Михайленко С.В., Шевчук О.В.* Озима пшениця: захист посівів від хвороб // Карантин і захист рослин. — 2008. — № 11. — С. 1—4.
8. *Федоренко В.П.* Інтегрований захист сільськогосподарських культур в Україні // Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. «Інтегрований захист рослин на початку ХХІ століття» (Київ, 1—5 листопада 2004). — К.: Колоб'іг, 2004. — С. 3—28.
9. *Черняєва І.М., Лучна І.С., Петренкова В.П., Кочуров Я.В.* Нові джерела стійкості пшениці м'якої озимої до хвороб в умовах північно-східної частини лісостепу України // Генетичні ресурси рослин. — 2012. — № 10/11. — С. 132—140.
10. *Aebi H.E.* Catalase // Methods in Enzymatic Analysis / Ed. H.U. Bergmeyer. — New York: Acad. Press, 1983. — **3**. — P. 273—286.
11. *Bradford M.* Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
12. *Giannopolitis C.N., Ries S.K.* Superoxide Dismutase. 1. Occurrence in higher plants // Plant Physiol. — 1977. — **59**, N 2. — P. 309—314.
13. *Guzman P., Ecker J.* Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants // Plant Cell. — 1990. — **2**, N 2. — P. 513—523.
14. *Naouari C.C., Nasraoui A.H., Carrayol E., Gowia H.* Response of two wheat genotype to long-term salinity stress in relation to oxidative stress and osmolyte concentration // Cereal Res. Communic. — 2013. — **41**, N 3. — P. 388—399.
15. *Ivanisova E., Ondrejovic M., Chmelova D. et al.* Antioxidant activity and polyphenol content in milling fractions of purple wheat // Ibid. — 2014. — **42**, N 4. — P. 578—588.

## РЕАКЦИЯ ЛИСТЬЕВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА РАЗВИТИЕ ПОРАЖЕНИЯ

16. Latef A.A. Changes of antioxidative enzymes in salinity tolerance among different wheat cultivars // *Ibid.* — 2010. — **38**, N 1. — P. 43–55.
17. Lu Z.-X., Gaudet D.A., Frick M. et al. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen // *J. Biochem. Mol. Biol.* — 2005. — **38**. — P. 420–431.
18. Meyer N., Lind V., Karlovsky P. et al. Development of a real-time PCR method for the identification of wheat genotypes carrying different eyespot resistance genes // *Plant Breed.* — 2011. — **130**. — P. 16–24.
19. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* — 1981. — **22**, N 5. — P. 867–880.
20. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* — 1976. — **57**, N 2. — P. 308–309.
21. Yang J., Zhang J., Liu K. et al. Abscisic acid and ethylene interact in wheat grains in response to soil drying during grain filling // *New Phytol.* — 2006. — **171**. — P. 293–303.

Отримано 13.07.2016

## РЕАКЦИЯ ЛИСТЬЕВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА РАЗВИТИЕ ПОРАЖЕНИЯ МУЧНИСТОЙ РОСОЙ

Т.П. Маменко, Е.А. Ярошенко

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Показано, что в листьях растений пшеницы устойчивого сорта Фаворитка развитие поражения мучнистой росой сопровождалось значительной интенсификацией активности супероксиддисмутазы, уменьшением содержания пероксида водорода и увеличением образования этилена. При этом на вторые сутки поражения активность антиоксидантных ферментов, а также содержание пероксида водорода были значительно выше, чем в листьях восприимчивого сорта Полеская 90. Это свидетельствует, что уже на начальных этапах поражения в листьях пшеницы устойчивого сорта защитные системы активируются значительно быстрее и эффективнее, что в дальнейшем ограничивает развитие болезни.

## REACTION OF WINTER WHEAT LEAVES ON DEVELOPMENT OF POWDERY MILDEW

T.P. Mamenko, O.A. Yaroshenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

It was shown that development of powdery mildew lesion of the leaves of plants resistant variety Favoritka accompanied by significant intensification of superoxide dismutase activity, decrease of hydrogen peroxide content and an increase in ethylene production. The initial activity of antioxidant enzymes and hydrogen peroxide content were significantly higher than in the leaves of susceptible variety Poliska 90. This indicates that already in the early stages of lesion protection systems in the leaves of resistant variety activated more quickly and efficiently, which further limits the development of disease.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, hydrogen peroxide, ethylene, phenylalanine ammonia lyase, *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal.