

Рослинництво, кормовиробництво

УДК 579.84:632.35:581.132:
58.035:581.2:633.1

© 2016

В.П. Патики,
академік НААН,
доктор
біологічних наук

Г.Б. Гуляєва,
Л.М. Буценко,
кандидати
біологічних наук

Т.М. Щербина

Б.О. Осипенко

Л.А. Пасічник,
доктор
біологічних наук

Інститут мікробіології
і вірусології імені
Д.К. Заболотного
НАН України

АНТИОКСИДАНТНА І ФОТОХІМІЧНА АКТИВНІСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ЗА ДІЇ PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. ATROFACIENS

Мета. Усебічно дослідити фізіологічні особливості дії збудника базального бактеріозу на стан, фотохімічну активність фотосинтетичного апарату, а також активність антиоксидантних ферментів рослин пшениці. **Методи.** Мікробіологічні, фізіологічні, біохімічні, статистичні. **Результати.** Узагальнено дані щодо підвищення рівня антиоксидантної активності листків пшениці: зростання каталазної і пероксидазної активності рослин пшениці ярої у фазі кушіння, інфікованих збудником базального бактеріозу. Виявлено інгібувальну дію *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на фотосинтетичний апарат рослин пшениці ярої сорту Печерянка — зниження вмісту пігментів у листках (хлорофілу а і b та каротиноїдів). Методом індукції флуоресценції хлорофілу показано пригнічення фотохімічної активності листків, що призводить до зниження ефективності темнових реакцій фотосинтезу. **Висновки.** Інфікування збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* призводить до зростання активності ферментів антиоксидантного захисту — каталазної і пероксидазної на 11-ту добу від початку інфікування, істотного скорочення пігментного складу листків інфікованих рослин пшениці ярої (хлорофілу а і b та каротиноїдів), а також до зниження ефективності темної фази фотосинтезу.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., пшениця яра, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, каталаза, пероксидаза, пігменти, індукція флуоресценції хлорофілу.

Серед зернових культур пшениця займає провідне місце у продовольчому сегменті ринку України, що дає змогу забезпечити

населення цінними харчовими продуктами, зокрема хлібобулочними виробами. Значну частину зерна пшениці відправляють

на експорт, поповнюючи бюджет країни, що особливо важливо в умовах сучасної економічної кризи. З огляду на це, великого значення надають пошуку засобів підвищення зернової продуктивності і якості зерна. Тому особливої уваги заслуговують дослідження дуже поширених бактеріальних хвороб та їх збудників, що нищать урожай або погіршують його якість. Одна з таких хвороб — базальний бактеріоз пшениці (збудник *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*), поширення якого у країнах ЄС становить близько 15%, а іноді, у сприятливі роки, може сягати 30–80% [9, 13]. За сильного ступеня розвитку хвороба найбільш негативно впливає на фізико-технологічні й біохімічні властивості зерна.

Мета досліджень. Усебічно дослідити фізіологічні особливості дії збудника базального бактеріозу на стан, фотохімічну активність фотосинтетичного апарату, а також активність антиоксидантних ферментів рослин пшениці.

Методика досліджень. Рослини пшениці ярої сорту Печерянка вирощували вегетативним методом на сірому лісовому ґрунті в умовах теплиці протягом 65–68 днів вегетації до фази повної стиглості. Штучне інфікування бактеріальною суспензією *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 щільністю $1 \cdot 10^9$ КУО/мл проводили на 7-добових рослинах. Схема досліді: 1 — контроль (неінфіковані рослини пшениці); 2 — рослини пшениці, інфіковані *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Повторність досліді 3-разова. Активність ферменту каталази (I.II.1.6) визначали титрометричним методом і виражали у кількості O_2 , що утворюється в результаті дії ферменту за 1 хв на 1 г сирої речовини ($мл O_2 \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$), а пероксидази (I.II.1.7) — за методом Бояркана [1] і виражали в умовних одиницях на 1 мг сирої речовини тканин. Ферментативну активність визначали на 11-ту добу від інфікування, пігментний склад листків — на 14-ту добу від інфікування методом екстракції у ДМСО з подальшою спектрометрією [7, 11]. Зміни функціонального стану фотосинтетичного апарату досліджували через тиждень після інфікування. Вплив інфікування збудником *P. syringae* pv. *atrofaciens* на стан і активність фотосинтетичного апарату здорових й уражених рослин пшениці ярої сорту Печерянка визначали біофізичним методом індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), фіксуючи дані за допомогою портативного приладу вітчизняного виробництва «Floratest» [8]. Прилад оснащено

рідиннокристалічним дисплеєм (128·64 пікселів) і виносним оптоелектронним сенсором із довжиною хвилі опромінення 470 ± 15 , площа опромінення плями — не менше 15 мм^2 , освітленості в її межах — не менше $2,4 \text{ Вт/м}^2$. Спектральний діапазон вимірювань інтенсивності флуоресценції — у межах 670–800 нм. Програмне забезпечення «Floratest», що йде у комплекті із приладом, приймає виміряні приладом дані через USB-порт комп'ютера та відображає їх у табличному або графічному вигляді [8]. Вимірювання ІФХ проводили через 7 і 12 діб після штучного ураження збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

Отриманий масив цифрових даних наводили у графічному вигляді. Розраховували відповідні критичні параметри ІФХ, що є відображенням змін у функціональних ланках фотосинтетичної системи [4, 5, 8]. Проаналізовані параметри: фонові флуоресценція (F_0); F_{pl} — показник «плато флуоресценції»; гасіння флуоресценції ($qF = (F_m - F_0)/F_0$); кількість Q_b — невідновлювальних комплексів, що не беруть участі у лінійному транспорті електронів $K_{pl} = (F_{pl} - F_0)/(F_m - F_0)$; ланка темної фіксації вуглецю — $K_i = (F_m - F_0)/F_m$ [3, 4, 5].

Статистичну обробку робили з використанням програми Statistica 8.0.

Результати досліджень. Дослідження впливу збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771 на активність антиоксидантних пігментів свідчить про істотне зростання каталазної (на 23%) і пероксидазної (у 2,2 раза) активності у листках інфікованих рослин пшениці ярої сорту Печерянка (табл. 1). Співвідношення ферментативної каталазної і пероксидазної активності мало таку динаміку: на контролі — 1,63, за бактеріального ураження — 0,9. Отже, за штучного зараження

1. Вплив збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* на активність антиоксидантних ферментів (11 діб інфікування)

Варіант досліді	Активність	
	каталазна, мл $O_2 \cdot г^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	пероксидазна, $\Delta D_{670} \cdot г^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
Контроль (без інфікування)	1,73±0,08	1,062±0,053
Інокуляція рослин пшениці <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9771	2,13±0,10	2,330±0,116

2. Вплив збудника базального бактеріозу на вміст фотосинтетичних пігментів у листках пшениці ярої сорту Печерянка (14 днів інфікування)

Варіант досліду	Пігмент		
	Хлорофіл а, мг/г	Хлорофіл b, мг/г	Каротиноїди
Контроль (без інфікування)	0,9±0,04	0,6±0,02	0,2±0,01
Інфікування рослин пшениці <i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> 9771	0,4±0,01	0,2±0,01	0,1±0,003

рослин пшениці ярої сорту Печерянка збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atofaciens* 9771 відбувалося підвищення активності термінальних оксидаз у тканинах листків і зниження їх співвідношення у бік пероксидазної активності (через тиждень після інфікування).

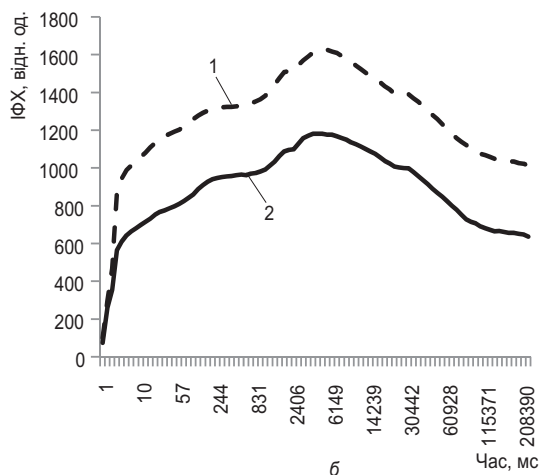
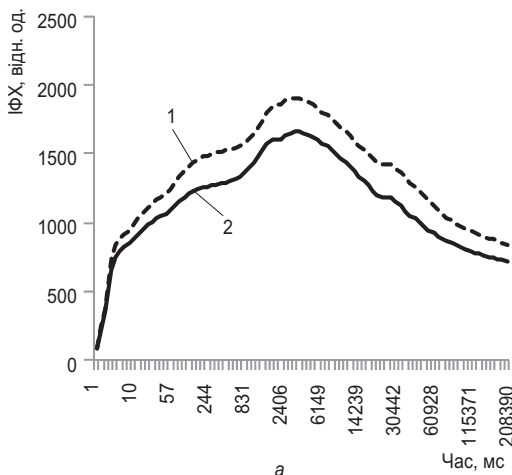
Як відомо, антиоксидантна система є механізмом системної фітостійкості. Антиоксидантні ферменти підтримують фітоімунітет рослин завдяки своїй здатності до деактивації вільних радикалів і їх похідних, що руйнують рослинну клітину [2, 6, 10]. Каталаза (ЕС 1.11.6) і пероксидаза (ЕС 1.11.7) як компоненти антиоксидантної системи відновлюють перекис водню до води, використовуючи як відновники різні сполуки [6].

Передбачають, що каталаза захищає клітину від перекису водню, що генерується внутрішньоклітинно, а пероксидаза — зумовлює специфічні внутрішньоклітинні окисні процеси з участю перекису та утворення важливих метаболітів [6, 10].

Отже, через 11 днів після ураження рослин ферментативна активність компонентів антиоксидантного захисту зростала, що стимулювало фітоімунітет дослідних рослин пшениці. Завдяки цьому гомеостаз рослинної клітини підтримувався на достатньому рівні для забезпечення захисту клітинних компонентів від руйнування вільними радикалами та їх похідними. Нами було передбачено, що метаболізм, спрямований на стабілізацію цілісності, ймовірно, знижує підтримку біосинтетичних процесів у тканинах.

Установлено зменшення вмісту в листках дослідних рослин основних фотосинтетичних пігментів: вміст хлорофілу а знизився на 55,5%, а хлорофілу b — на 66,7%. Уміст каротиноїдів, що є додатковими пігментами, а також виконують захисну функцію, знизився вдвічі (табл. 2).

На початковому етапі розвитку симптомів базального бактеріозу (через тиждень після інфікування рослин пшениці ярої його збудником *P. syringae* pv. *atofaciens* 9771)



Індуковані зміни флуоресценції хлорофілу за штучного інфікування *P. syringae* pv. *atofaciens* 9771 рослин пшениці ярої сорту Печерянка: а — на 7-му; б — на 12-ту добу після інфікування; 1 — інфікування *P. syringae* pv. *atofaciens*; 2 — контроль (вода)

3. Критичні точки ІФХ за дії збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atofaciens* рослин пшениці ярої сорту Печерянка

Варіант досліджу	Параметри				
	F ₀	F _{pl}	K _{pl}	qF	K _i
<i>7 днів після інокуляції</i>					
Контроль (без інфікування)	656	1189	0,58	1,32	0,57
Інфікування рослин пшениці <i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> 9771	731	1456	0,65	1,28	0,56
<i>12 днів після інокуляції</i>					
Контроль (без інфікування)	565	909	0,39	1,57	0,57
Інфікування рослин пшениці <i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> 9771	875	1291	2,60	0,17	0,37

спостерігали істотне підвищення ферментативної активності компонентів антиоксидантного захисту — каталази і пероксидази, що свідчить про запуск механізмів клітинного фітоімунітету. Проте за цих умов уміст основних фотосинтетичних пігментів у листових пластинках знижувався вдвічі. До цього могло призвести зниження рівня витрати асимілатів на біосинтетичні процеси або швидке руйнування пігментних комплексів за окиснюваного стресу. Тому для з'ясування особливостей впливу інфікування рослин пшениці ярої *P. syringae* pv. *atofaciens* ми дослідили його вплив на окремі функціональні ланки фотосинтетичного апарату біофізичним методом ІФХ за допомогою портативного приладу «Floratest». Типові індукційні криві Каутського відображають вплив на функціональні ланки ФС II (рисунок).

Аналіз критичних параметрів ІФХ виявив збільшення непродуктивних витрат квантів світла за його міграції по пігментній матриці на початку швидкої фази флуоресценції (про це свідчить зміна параметра F₀), коли всі реакційні центри відкриті і до них потрапляє максимум енергії збудження (табл. 3). Підвищення фонові флуоресценції (F₀) на 11,4% (через 7 днів після інфікування) та на 54,9% (через 12 днів) свідчить про істотне зменшення ефективності поглинання квантів світла завдяки деградації пігментних комплексів і зменшення концентрації хлорофілу в листках. Це підтверджено аналізом умісту хлорофілу *a* (див. табл. 2), оскільки відомо, що саме цей пігмент має здатність до флуоресценції і входить до складу ФС II. Істотне зростання F_{pl} (на 42%) є показником блокування електронного транспорту в електронтранспортному ланцюзі, а отже, зниження ефективності залучення фотонів

у «світловій» фазі фотосинтезу. Про це також свідчить 6-разове збільшення показника K_{pl} за бактеріального інфікування, що свідчить про критичне зростання вмісту Q_b — невідновлювальних комплексів, які не беруть участі у лінійному транспорті електронів (табл. 3).

За цих умов коефіцієнт індукції (K_i), який корелює з активністю рибулозобісфосфат карбоксилази (основного ферменту циклу Кальвіна) й зазвичай свідчить про ефективність темнових реакцій фотосинтезу [3], був на рівні контролю, а на 12-й день ураження знижувався на 35%. Це свідчить про поступове пригнічення ефективності темнових процесів із ростом впливу збудника базального бактеріозу, що поглиблювався із часом.

Однак рівень флуоресценції залежить від цілої низки молекулярно-біохімічних процесів, активація яких за адаптації до світла призводить до зниження рівня сигналу флуоресценції хлорофілу (гасіння флуоресценції, qF) [5, 12]. Фотохімічний його бік (фотохімічне гасіння) залежить від окисно-відновлювального стану первинного переносника електронів — Q_A, тоді як не фотохімічне — від рівня теплової дисипації енергії збудження. Водночас рівень фотохімічного гасіння може варіювати в широких межах, підвищуючись за відновлення Q_A й знижуючись за його окиснення, що контролюється головним чином рівнем метаболізму вуглецю (цикл Кальвіна) [5]. Істотне зниження цього показника щодо його рівня у контрольних рослин через тиждень і його поглиблення через 12 днів після ураження фітопатогеном свідчить про зростання рівня окисності первинного переносника фотохімічної енергії Q_A, а отже, інгібування процесів, що підтримують електронний транспорт, і процесів, у яких витрачаються АТФ і НАДФН₂.

Висновки

Інфікування збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* призводить до зростання активності ферментів антиоксидантного захисту — каталазної і пероксидазної на 11-ту добу від початку інфікування. Водночас спостерігається істотне скорочення пігментного складу листків інфікованих рослин пшениці ярої: хлорофілу *a*, *b* і каротиноїдів. Виявлено функціональні порушення фотосинтетичного апарату рослин

пшениці ярої, інфікованої збудником базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9771: зниження кількості активного хлорофілу, залученого до передачі електронів на реакційні центри, зростання кількості Q_b — невідновлювальних комплексів, які не беруть участі у лінійному транспорті електронів. Це призводить до пригнічення ефективності темної фази фотосинтезу, тобто погіршення асиміляції вуглецю.

Бібліографія

1. Воскресенская О.Л. Большой практикум по биоэкологии. — Ч. 1: учеб. пособие/О.Л. Воскресенская. — Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т., 2006. — 107 с.
2. Газарян И.Г. Особенности структуры и механизм действия пероксидазы растений/И.Г. Газарян, Д.М. Хушпульян, В.И. Тишков//Успехи биол. химии. — 2006. — 46. — С. 303–322.
3. Діагностика вірусної інфекції смородини чорної та малини методом індукції флуоресценції хлорофілу листків/М.М. Кирик, Ю.М. Тарануха, М.П. Тарануха та ін.//Вісн. аграр. науки. — 2011. — № 10. — С. 26–28.
4. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу: метод. вказівки для студентів біологічного факультету/О.В. Брайон, Д.Ю. Корнеєв, О.О. Снегур, О.І. Китаєв. — К.: Вид.-поліграф. центр «Київський університет», 2000. — 15 с.
5. Корнеєв Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла/Д.Ю. Корнеєв. — К.: Альтерпрес, 2002. — 191 с.
6. Мирошниченко О.С. Биосинтез, физиологическая роль и свойства каталазы/О.С. Мирошниченко//Биополимеры и клетка. — 1992. — 8, № 6. — С. 3–25.
7. Пастушенко Л.Т. Серологические группы фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*. II.

Антигенное родство различных видов/Л.Т. Пастушенко, И.Д. Симонович//Микробиол. журн. — 1979. — 41, № 4. — С. 330–339.

8. Портативний флуорометр «Флоротест»: настанова з експлуатації. — Інститут кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України, 2013. — 24 с.

9. Фітопатогенні бактерії, бактеріальні хвороби рослин: монографія/Р.І. Гвоздяк, Л.А. Пасічник, Л.М. Яковлева [та ін.]; за ред. В.П. Патики. — К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. — 444 с.

10. Bolwell G.P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense—broad perspective/G.P. Bolwell, P. Wojtaszek//Physiol. Mol. Plant Pathol. — 1997. — 51. — P. 347–366.

11. Hisox J.D. The method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration/J.D. Hisox, R.J. Israelstam//Can. J. Bot. — 1979. — V. 57, № 12. — P. 1332–1334.

12. Horton P. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence/P. Horton, A. Ruban, R.G. Walters//Plant Physiol. — 1994. — V. 106, № 2. — P. 415–420.

13. Patyka V.P. Phytopathogenic bacteria in the system of modern agriculture/V.P. Patyka, L.A. Pasichnyk//Mikrobiolohichnyi zhurnal. — 2014. — 76, №1. — P. 21–26.

Надійшла 19.10.2015.