

УДК [632.4 + 58.036]:633.16

Л. М. АБРАМЧИК, Е. В. СЕРДЮЧЕНКО, Л. В. ПАШКЕВИЧ, В. Н. МАКАРОВ,  
Л. А. ЗЕНЕВИЧ, Л. Ф. КАБАШНИКОВА

### СТРЕССОВЫЕ РЕАКЦИИ ЗЕЛЕННЫХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ ИНФИЦИРОВАНИЯ ПАТОГЕННЫМ ГРИБОМ *BIPOLARIS SOROKINIANA* (SACC.) ШНОЕМ И ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: kabashnikova@ibp.org.by

(Поступила в редакцию 24.12.2014)

**Введение.** В постоянно изменяющихся условиях внешней среды растения подвергаются воздействию различных факторов биотической и абиотической природы, к негативному влиянию которых им приходится адаптироваться, формируя механизмы противодействия. К объективным причинам значительного снижения урожая важнейших продовольственных культур можно отнести заражение возбудителями грибных болезней. Огромное разнообразие грибных патогенов, их высокая вариабельность и колоссальная способность приспосабливаться к растению-хозяину представляет собой серьезную проблему в защите растений. Ежегодно Беларусь теряет около 30–35 % от потенциально возможного урожая сельскохозяйственных культур, из которых около 20–25 % приходится на долю вредных насекомых-фитофагов и инфекционных болезней. Одним из опаснейших патогенов является гриб *Bipolaris sorokiniana* (синоним – *Helminthosporium sativum*), который вызывает гельминтоспориозную корневую гниль [1]. Патоген может поражать и листья, вызывая образование темных или темно-серых пятен, слегка вытянутых вдоль центральной жилки [2]. Во влажную погоду, при влажности свыше 90 %, гриб поражает колос, что приводит к формированию недоразвитого и щуплого зерна [3]. Экологические условия играют важную роль как в возникновении заболевания, так и в его развитии. В то же время в зависимости от этих факторов формируется устойчивость растений к заражению патогенами в различные периоды вегетации. Температура среды является одним из основных факторов, определяющих возможность возникновения заболевания растений и степень его вредоносности. Влияние этого фактора начинает проявляться уже на первых этапах инфекционного процесса, обуславливая жизнеспособность возбудителя болезни и вероятность его сохранения к началу вегетационного периода [4].

Одной из первоочередных задач современной биологии является выявление путей формирования устойчивости растений к патогенным микроорганизмам. Установлено, что уровень устойчивости растений к фитозаболеваниям обеспечивается многими физиолого-биохимическими показателями, отвечающими за перестройку метаболизма растений и сохранение жизнеспособности в стрессовых условиях [5]. В этой связи изучение биохимических особенностей инфицированного растения представляет важный этап на пути познания природы устойчивости к патогенным микроорганизмам и создания системы критериев оценки устойчивости к биотическому стрессу.

Цель работы – изучение влияния патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата (ФСА) и состояние защитной системы растений ячменя в условиях гипертермии.

**Материалы и методы исследования.** Для проведения опытов использовали 6-дневные зеленые проростки ячменя сорта Магутны. Проростки выращивали в лабораторных условиях при

16-часовом фотопериоде, на полихроматичном белом свете ( $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ), при температуре 22/16 °С (день/ночь), на специальных сетках на слое фильтровальной бумаги, увлажненной водой.

Тепловой шок (ТШ) для интактных проростков ячменя создавался в воздушном термостате ТС-80М-2 в течение 3 ч при 40 °С и постоянном освещении (интенсивность  $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ).

Для создания грибного инфицирования проростков ячменя использовали фитопатогенный гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoeb., вызывающий темно-бурую пятнистость листьев. Инокуляцию зеленых проростков ячменя патогеном *Bipolaris sorokiniana* осуществляли путем опрыскивания 4-дневных листьев споровой взвесью, содержащей  $10^6$  спор/мл. В качестве контрольного варианта были взяты незараженные растения, выращенные в идентичных условиях. Тепловую обработку инфицированных 6-дневных проростков осуществляли в термостате при 40 °С в течение 3 ч. Анализ физиологического состояния проростков проводили сразу после ТШ.

Количество пигментов в ацетоновых экстрактах определяли по спектрам поглощения, снятым на спектрофотометре Shimadzu, UV – 2401 РС. Расчет производили по формулам, предложенным в [6].

Общий уровень активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью флуоресцентного теста, в основе которого лежит образование дихлорфлуоресцеина (ДХФ) из нефлуоресцирующего дихлорфлуоресцеин-диацетата в экстрактах листьев [7]. Данная методика позволяет судить об общем содержании АФК в клетке без идентификации их отдельных форм.

Определение содержания пероксида водорода в экстрактах листьев проводили с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ , катализируемая пероксидазой хрена [8].

Активность общей пероксидазы измеряли по методу, предложенному в работе [9], используя бензидин и пероксид водорода.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) тестировали по количеству малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой, с последующим измерением оптической плотности на спектрофотометре Shimadzu, UV–2401 РС при длине волны 532 нм [10]. Количество МДА рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции  $1,55 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Статистическую обработку данных проводили по методике, предложенной в работе [11].

Флуоресцентные параметры фотосистемы 2 (ФС 2) измеряли на флуориметре Teaching-РАМ (pulse amplitude modulation) (Walz, Германия). Перед измерением листья адаптировали к темноте в течение 15 мин. Включение модулированного с низкой частотой (32 Гц) слабого света ( $630 \text{ нм}$ ,  $0,04 \text{ мкмоль} \cdot \text{квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) возбуждало фоновую флуоресценцию  $F_0$ . Световой импульс ( $\lambda = 663 \text{ нм}$ ) высокой интенсивности ( $3300 \text{ мкмоль} \cdot \text{квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) увеличивал квантовый выход флуоресценции до максимального уровня  $F_m$ . Потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС 2 был рассчитан по формуле  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  [12].

Активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН [13]. Скорость окисления НАДФН регистрировали на спектрофотометре Shimadzu, UV–2401 РС по уменьшению адсорбции при 340 нм в течение 5 мин и рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции  $6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Содержание белка во фракциях измеряли по методу Лоури [14].

**Результаты и их обсуждение.** В табл. 1 приведены результаты исследования влияния действия биотического и абиотического факторов на состояние пигментного аппарата зеленых проростков ячменя, оцениваемое по количеству хлорофиллов (Хл) и каротиноидов и их соотношению. Из табл. 1 видно, что в результате действия *B. sorokiniana* как при нормальной, так и при повышенной температуре количественное содержание фотосинтетических пигментов в листьях ячменя в расчете на единицу сухой массы существенно не изменялось по сравнению с контрольным вариантом. Оставалось стабильным и соотношение хлорофиллов ( $a/b$ ) во всех вариантах опыта.

Из литературных данных известно, что гриб *B. sorokiniana* наряду с токсинами продуцирует в растительных тканях вещества цитокининовой природы, которые стимулируют биосинтез многих веществ, в том числе и хлорофилловых пигментов [5]. Этим, возможно, и объясняется относительно стабильное состояние Хл в растении после грибного заражения.

Т а б л и ц а 1. Содержание фотосинтетических пигментов в зеленых проростках ячменя в условиях теплового шока (ТШ) и при воздействии патогенной инфекции *B. sorokiniana* (мг/г сухой массы)

Вариант	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Хл ( <i>a + b</i> )	Каротиноиды	Хл <i>a</i> /хл <i>b</i>	Хл/каротиноиды
Контроль	12,22 ± 0,73	3,732 ± 0,24	15,952 ± 0,97	3,472 ± 0,21	3,282 ± 0,03	4,592 ± 0,04
<i>B. sorokiniana</i>	11,562 ± 0,53	3,582 ± 0,17	15,142 ± 0,69	3,482 ± 0,11	3,232 ± 0,01	4,352 ± 0,07
ТШ	13,162 ± 0,53	4,042 ± 0,15	17,202 ± 0,67	3,752 ± 0,19	3,252 ± 0,01	4,592 ± 0,05
<i>B. sorokiniana</i> + ТШ	12,082 ± 0,43	3,732 ± 0,14	15,812 ± 0,58	3,642 ± 0,17	3,242 ± 0,03	4,352 ± 0,11

В качестве индикатора функционального состояния фотосинтетических мембран были использованы параметры флуоресценции Хл, изменение которых отражает структурные и функциональные характеристики фотосинтетической электрон-транспортной цепи [15]. Флуоресценция Хл широко используется не только для исследования первичных стадий фотосинтеза, но и для трактовки изменений в ФСА под влиянием различных факторов окружающей среды [12]. В табл. 2 приведены результаты исследований функциональной активности ФС 2 хлоропластов методом РАМ-флуориметрии в инфицированных *B. sorokiniana* листьях в условиях нормальной и повышенной температуры.

Т а б л и ц а 2. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* и теплового шока (ТШ) (3 ч при 40 °С) на показатели фотохимической активности мембран хлоропластов листьев ячменя

Вариант	$F_0$	$F_m$	$F_v$	$F_v/F_m$
Контроль	0,1162 ± 0,002	0,5602 ± 0,016	0,4452 ± 0,016	0,7942 ± 0,007
ТШ	0,1232 ± 0,001	0,5692 ± 0,020	0,4462 ± 0,019	0,7842 ± 0,007
<i>B. sorokiniana</i>	0,0952 ± 0,002	0,5092 ± 0,012	0,4542 ± 0,012	0,8912 ± 0,006
<i>B. sorokiniana</i> + ТШ	0,1152 ± 0,005	0,5592 ± 0,013	0,4442 ± 0,008	0,7942 ± 0,004

Установлено, что инфицирование проростков ячменя *Bipolaris sorokiniana* оказывает негативное действие на уровни базовой ( $F_0$ ) и максимальной ( $F_m$ ) флуоресценции Хл *a*, что отразилось и на потенциальном квантовом выходе фотохимических реакций ФС 2 ( $F_v/F_m$ ). Полученные данные свидетельствуют о нарушении протекания первичных реакций разделения зарядов в реакционном центре ФС 2 в условиях инфицирования проростков патогенным грибом. Совместная обработка патогеном и повышенной температурой практически не влияла на параметры индукции флуоресценции Хл, которые оставались на контрольном уровне.

Известно, что важную роль в регуляции взаимоотношений системы растение–патоген играют АФК и прежде всего перекись водорода [16]. В научной литературе накоплены сведения об участии различных АФК в трансдукции сигналов, приводящих к активации ферментов-антиоксидантов и экспрессии их генов. Однако генерация АФК выполняет защитную функцию только на ранних этапах взаимодействия растения и патогена. Продолжительная и избыточная продукция АФК, характерная для восприимчивых растений, способствует развитию и распространению инфекции.

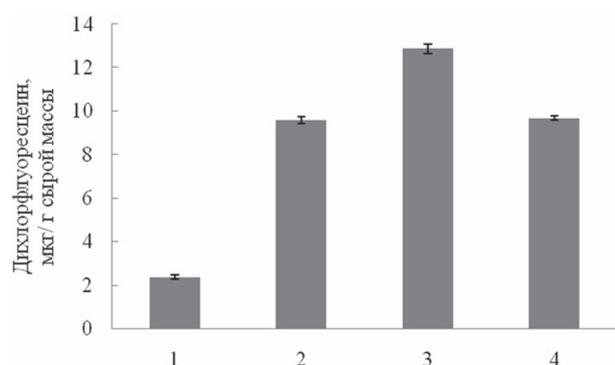


Рис. 1. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* и теплового шока (ТШ) на уровень АФК в листьях 6-дневных проростков ячменя: 1 – контроль; 2 – *Bipolaris sorokiniana*; 3 – ТШ (40 °С, 3 ч); 4 – *Bipolaris sorokiniana* + ТШ

Установлено, что после стрессовых воздействий общий уровень АФК в проростках ячменя возрастает в 3,3–4,5 раза относительно контроля (рис. 1). При этом максимальная генерация АФК (в 5,6 раза по сравнению с контролем) наблюдалась в растениях ячменя, подвергнутых гипертермии. Грибное заражение как на фоне теплового шока, так и без него усиливало продукцию АФК только в 3 раза.

Известно, что перекись водорода, являясь наиболее стабильной формой АФК, опосредует лигнификацию клеточной стенки растения для механической изоляции патогена, явля-

ется сигнальной молекулой в запуске каскада защитных реакций растений [17], а в высокой концентрации может подавлять рост микроорганизмов. Установлено, что инокуляция зеленых проростков ячменя спорами гриба *Bipolaris sorokiniana* вызывает повышение уровня перекиси водорода в растительной ткани (рис. 2). При действии гипертермии зарегистрирован также значительный всплеск содержания  $H_2O_2$  в растениях ячменя. Стимулирующее действие ТШ на процессы образования  $H_2O_2$  проявляется и при сочетанном действии теплового фактора и патогена (рис. 2).

Для выяснения природы окислительного стресса, развивающегося при действии гипертермии и грибном заражении, была рассмотрена активность НАДФН-оксидазы, поскольку считается, что за быстрое образование АФК ответственен именно этот фермент. Продуктом НАДФН-оксидазы является супероксидный радикал, который в результате реакций, катализируемых супероксиддисмутазой, быстро превращается в перекись водорода [18]. Анализ активности НАДФН-оксидазы в проростках ярового ячменя после действия гипертермии и грибного заражения подтвердил участие данного фермента в развитии окислительного стресса под влиянием перечисленных факторов (рис. 3). Совместное действие патогенной инфекции и гипертермии вызвало повышение активности НАДФН-оксидазы – фермента, катализирующего одноэлектронное восстановление кислорода с образованием АФК, о чем свидетельствует тесная корреляционная зависимость между активностью фермента и накоплением АФК в листьях ячменя.

Первичной реакцией растений на действие неблагоприятных факторов различной природы является интенсификация ПОЛ биомембран, вызванная усилением генерации АФК, что может приводить при сильных воздействиях к значительным нарушениям внутриклеточного гомеостаза [19]. Для характеристики развития окислительных процессов в проростках ячменя в условиях действия на них абиотического и биотического стрессов определяли содержание МДА, количество которого характеризует активность ПОЛ и является одним из важнейших показателей устойчивости растений в условиях стресса.

В условиях гипертермии интенсивность ПОЛ в растениях ячменя возрастала, а уровень МДА в клетке превышал контрольные значения на 21 %. В то же время содержание МДА в растениях, зараженных грибом *B. sorokiniana*, оставалось практически на уровне контроля. Стабилизация процессов ПОЛ наблюдалась при совместном действии на проростки ячменя двух стрессовых факторов, что, возможно, связано с прямым защитным действием веществ цитокининовой природы, продуцируемых *Bipolaris sorokiniana*, которые участвуют в стабилизации биомембран через стимуляцию синтеза белков [5].

Стресс-индуцированное возрастание АФК может оказывать негативное влияние на жизнеспособность растительных клеток, что требует контроля их уровня. Для снижения уровня АФК растения используют механизмы детоксикации, связанные с индукцией ферментов антиоксидантной системы. Одним из наиболее важных антиоксидантных ферментов, являющихся показателем неспецифического иммунитета, является пероксидаза, активность и спектр изоформ которой меняются под действием биологических и небиологических агентов. Изучение

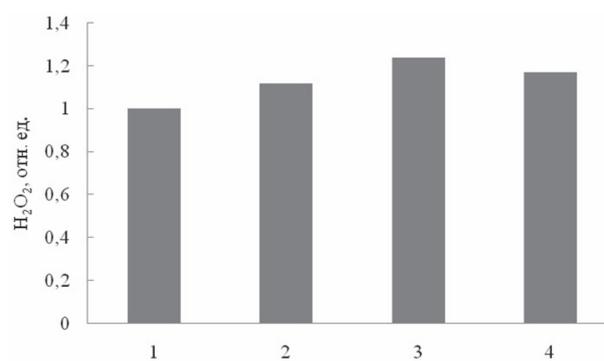


Рис. 2. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* и теплового шока (ТШ) на содержание  $H_2O_2$  в листьях 6-дневных проростков ячменя: 1 – контроль; 2 – *Bipolaris sorokiniana*; 3 – ТШ (40 °C, 3 ч); 4 – *Bipolaris sorokiniana* + ТШ

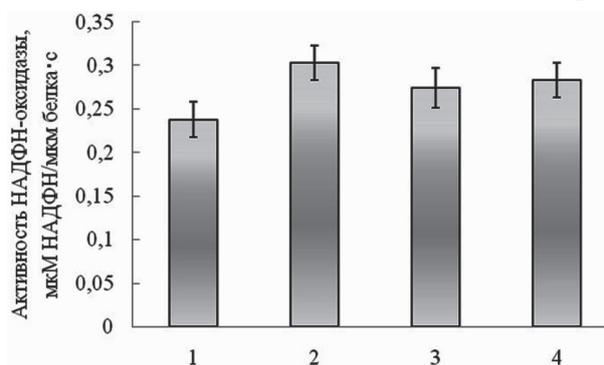


Рис. 3. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* и теплового шока (ТШ) на активность НАДФН-оксидазы в листьях 6-дневных проростков ячменя: 1 – контроль; 2 – *Bipolaris sorokiniana*; 3 – ТШ (40 °C, 3 ч); 4 – *Bipolaris sorokiniana* + ТШ

Т а б л и ц а 3. Влияние теплового шока (ТШ) и патогенного гриба *B. sorokiniana* на содержание продуктов ПОЛ в зеленых проростках ячменя

Вариант	Содержание МДА, мМ/мг сырой массы
Контроль	4,732 ± 0,06
<i>B. sorokiniana</i>	4,402 ± 0,15
ТШ	5,732 ± 0,11
<i>B. sorokiniana</i> + ТШ	3,642 ± 0,09

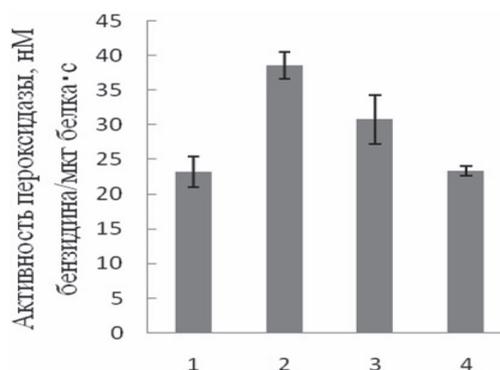


Рис. 4. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* и теплового шока (ТШ) на активность пероксидазы в листьях 6-дневных проростков ячменя: 1 – контроль; 2 – *Bipolaris sorokiniana*; 3 – ТШ (40 °С, 3 ч); 4 – *Bipolaris sorokiniana* + ТШ

влияния абиотического и биотического стрессов на изменение активности пероксидазы в проростках ячменя показало, что инфицирование растений спорами гриба *B. sorokiniana* вызывало увеличение активности фермента по отношению к контролю в 1,6 раза. Повышение активности фермента в 1,3 раза отмечалось и после прогревания проростков. При этом совместное воздействие абиотического и биотического факторов не сопровождалось повышением активности фермента и соответствовало контрольному значению (рис. 4).

**Заключение.** Изучение особенностей реакции фотосинтетического аппарата проростков ячменя на биотический стресс показало, что пигментный аппарат инфицированных растений был относительно устойчив к гипертермии, о чем свидетельствовала неизменность содержания фотосинтетических пигментов после заражения патогенным грибом. Анализ действия патогенной инфекции на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата проростков ячменя выявил нарушение эффективности протекания фотохимических реакций в реакционных центрах ФС 2, обусловленное снижением максимальной и вариабельной флуоресценции Хл. Наблюдаемое в этих условиях снижение уровня базовой флуоресценции свидетельствует о нарушении функционирования светособирающей системы. Выявлен положительный эффект совместного действия гипертермии и патогена на функциональную активность ФС 2 хлоропластных мембран. Так, показано, что прогревание инфицированных проростков ячменя способствует восстановлению нарушенной патогеном функциональной активности ФС 2. Данный результат позволяет говорить о защитной роли температурного фактора в поддержании стабильности фотосинтетических мембран, что обеспечивает нормальное протекание фотохимических реакций ФС 2 в инфицированных проростках ячменя.

Результаты исследования показали, что в условиях патогенной инфекции в зеленых проростках ячменя развиваются признаки окислительного стресса, о котором можно судить по увеличению общего уровня АФК и пула участвующей в запуске защитных систем клетки перекиси водорода.

Установлена ведущая роль НАДФН-оксидазы – ключевого фермента НАДФН-оксидазной сигнальной системы в развитии окислительного стресса растении ярового ячменя при действии абиотического и биотического факторов, о чем свидетельствует тесная корреляционная зависимость между активностью фермента и накоплением АФК в листьях ячменя. При этом наблюдается увеличение активности одного из ключевых антиоксидантных ферментов пероксидазы, который играет важную роль в защите от окислительного стресса. Существенное повышение активности пероксидазы, осуществляющей детоксикацию АФК, судя по всему, способствовало тому, что в условиях патогенной инфекции уровень продуктов перекисидации липидов клеточных мембран растений не превышал контроль. Можно предположить, что именно пероксидаза определяет степень устойчивости растений к фитопатогену в данных условиях.

Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что ответная реакция проростков ячменя в условиях действия биотического и абиотического факторов включает участие фермента НАДФН-оксидазы, заключающееся в генерации АФК. При этом наблюдается увеличение актив-

ности антиоксидантного фермента пероксидазы, что, по-видимому, способствует снижению интенсивности процессов перекисидации липидов клеточных мембран растений ячменя. Выявлен положительный эффект совместного действия гипертермии и патогена на функциональную активность ФС 2 хлоропластных мембран.

## Литература

1. Тупеневич С. М. Корневые гнили яровой пшеницы. Л., 1974.
2. Пересыпкин В. Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. М., 1989.
3. Duveiller E. // Plant Pathol. 2000. Vol. 19. P. 235–242.
4. Яруллина Л. Г. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. Уфа, 2006.
5. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа, 2001.
6. Шлык А. А. // Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971. С. 154–170.
7. Le Bel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. // Chem. Res. Toxicol. 1992. Vol. 9, N 6. P. 304–307.
8. Okuda T., Matsuda Y., Yamataka A. et al. // Plant Physiol. 1991. Vol. 97, N 3. P. 1265–1267.
9. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. М., 1975.
10. Курганова Л. Н., Веселов А. П., Сеницына Ю. В., Еликова Е. А. // Физиол. раст. 1999. Т. 46, № 2. С. 218–222.
11. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973.
12. Корнеев Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев, 2002.
13. Pinton R., Cakmak I., Marschner H. // J. Exp. Bot. 1994. Vol. 45, N 1. P. 45–50.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A. L., Randall R. I. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 2. P. 215–275.
15. Krause G. H., Weis E. // Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol. 1991. Vol. 32. P. 313–349.
16. Тарчевский И. А. // Физиол. раст. 2000. Т. 47, № 2. С. 321–331.
17. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. М., 2002. – 284 с.
18. Глянько А. К. и др. // Вестн. Харьков. нац. аграр. ун-та. Сер. Биология. 2009. Вып. 2 (17). С. 6–18.
19. Барабой В. А. // Успехи соврем. биологии. 1991. Т. 111. Вып. 6. С. 923–932.

L. M. ABRAMCHIK, E. V. SERDIUCHENKO, L. V. PASCHKEVICH, V. N. MAKAROV,  
L. A. ZENEVICH, L. F. KABASCHNIKOVA

### STRESS REACTIONS OF BARLEY GREEN SEEDLINGS UNDER THE CONDITIONS OF INFECTING BY *BIPOLARIS SOROKINIANA* (SACC.) SHOEM AND INCREASED TEMPERATURE

#### Summary

Influence of pathogenic mushroom of *Bipolaris sorokiniana* is studied on the structural-functional state of photosynthetic apparatus and state of the protective system of barley plants under the conditions of increased temperature.

It is shown that return reaction of barley seedlings under the conditions of the united action biotic and abiotic factors includes activating of NADP-oxidase enzyme, that results in the increase generation of general level of active forms of oxygen, including hydrogen peroxide, participating in the start of the protective systems of the cell. Warming up the infected plants did not influence on activity of peroxidase enzyme, carrying out the detoxication of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but there the decline of intensity of lipids oxidization processes was observed, that supposes participation of other components of the antioxidant system in AFO neutralizing. The positive effect of the cooperative action of the hyperthermia and the pathogen on functional activity of PS 2 in the chloroplast membranes is revealed.