

## КЛЕТОЧНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУННОЙ РЕАКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНОМ *Lr19* НА ЗАРАЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕМ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ

© Л. Я. Плотникова

Кафедра селекции, генетики и физиологии растений Омского государственного аграрного университета;  
электронный адрес: LPlotnikova@rambler.ru

В иммунной линии пшеницы сорта Тэтчер механизм действия гена устойчивости *Lr19* на возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* был сходен с влиянием видов-нехозяев. Развитие гриба в ткани растений подавлялось на ранних стадиях, в его клетках выявлены нарушения структуры ядер и митохондрий. В растительных клетках была изменена структура клеточных мембран, дезорганизованы хлоропласты, появились крупные агрегаты хроматина в ядрах и отложения на клеточных стенках. Реакция сверхчувствительности проявлялась после прекращения развития гриба.

Ключевые слова: иммунитет, гистология, ультраструктура клеток, *Triticum aestivum*, *Puccinia triticina*, реакция сверхчувствительности.

Принятые сокращения: МКГ — материнская клетка гаустория, ПУВ — подустычная везикула.

Бурая ржавчина пшеницы, вызываемая паразитическим грибом *Puccinia triticina* Erikss., является одним из наиболее вредоносных заболеваний пшеницы в России (Санин, 1997).

Возбудитель бурой ржавчины — высокоспециализированный гриб, он развивается в ткани листа пшеницы и имеет биотрофный тип питания. Заражение растения начинается с попадания урединиоспоры на поверхность листа. В присутствии влаги спора образует ростковую трубку, которая направляется к устьицу и формирует на нем специальный орган — аппрессорий. На восприимчивых растениях цитоплазма аппрессориев без задержки перемещается в подустычные везикулы (ПУВ) в подустычных камерах листьев, далее в мезофильной ткани формируется мицелий паразита (Плотникова и др., 2005а).

*P. triticina* взаимодействует с растением на клеточном уровне, поэтому цитологические исследования дают ценную информацию для понимания механизмов устойчивости растений. В связи с этим целью работы было изучение клеточной основы иммунитета к бурой ржавчине линии мягкой пшеницы с высокоэффективным геном *Lr19*.

### Материал и методика

В качестве объектов исследований были использованы листья 9-суточных проростков почти изогенных линий мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Тэтчер. При заражении моноспоровой суспензией урединиоспор клона 77 расы возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss. с генотипом  $P_9P_{19}P_{24}P_{28}P_{38}$  растения иммунной линии с геном *Lr19* проявляли тип реакции 0 баллов по шкале Майнса—Джексона (Mains, Jackson, 1926).

В качестве контроля были использованы растения восприимчивой линии с геном *Lr14a* с типом иммунитета 4 балла.

Зараженный материал культивировали по методу отсеченных листьев в чашках Петри на 0.01%-ном растворе бензимидазола на светоустановке (Михайлова, Квитко, 1970). Листья фиксировали через 24, 36, 72 и 144 ч после инокуляции 2%-ным и 6%-ным растворами глутаральдегида (6 и 12 ч соответственно) в 0.15 М фосфатном буфере, pH 7.2, затем 2%-ным раствором  $OsO_4$  (8 ч) (Harder et al., 1979). После фиксации материал обезвоживали и заключали в смесь смол Эпон—Аралдит.

Приготовление полутонких и ультратонких срезов проводили с помощью стеклянных ножей на ультрамикротоме LKB-IV (Швеция) по общепринятым методикам (Бирюзова и др., 1963).

Гистологические исследования проводили с помощью светового микроскопа МБИ-15 на серийных полутонких срезах, окрашенных красителем азуром—метиленовым голубым. Срезы окрашивали в течение 1.5 мин при нагревании в смеси красителей: 1%-ного метиленового голубого в 1%-ном растворе буры и 1%-ного водного раствора азура II (Juniper et al., 1970). В каждом варианте опыта изучали развитие гриба в 20 инфекционных местах на 5 растениях. Размеры гаусториев определяли с помощью окуляр-микрометра при увеличении 900×.

Ультраструктурные исследования проводили на ультратонких срезах, окрашенных 2%-ным раствором уранил-ацетата и насыщенным щелочным раствором цитрата свинца (Raynolds, 1963). Срезы изучали на трансмиссионном микроскопе МБИ-100.

Использованные реактивы: глутаральдегид (Sigma, Aldrich, Германия); четырехокись осмия и бензимидазол (Fluka, США); смолы Эпон (Fluka AG, Швейца-

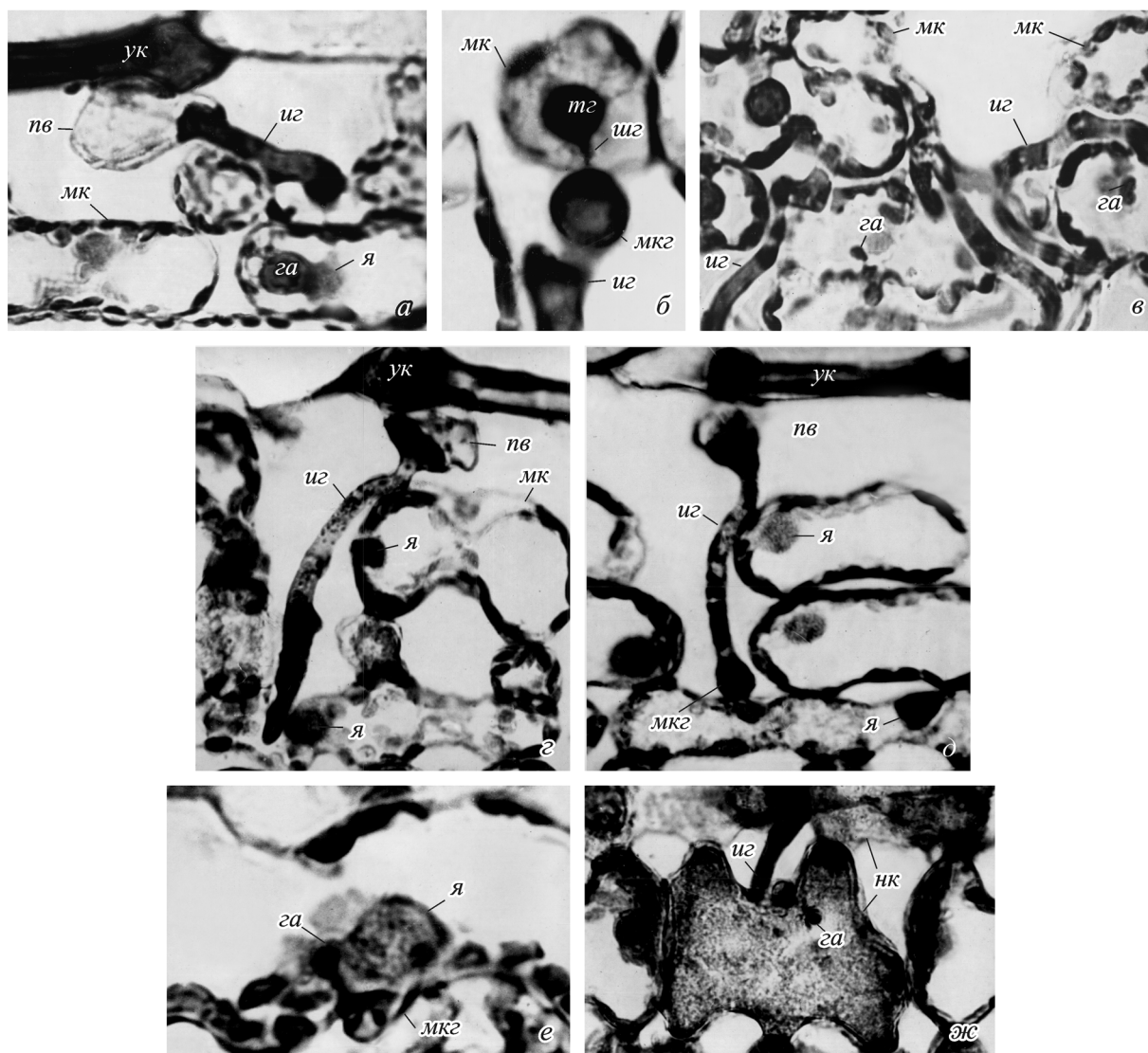


Рис. 1. Развитие гриба *Puccinia triticina* в листьях восприимчивой изогенной линии сорта Тэтчер с геном *Lr14a* (а–в) и иммунной линии с геном *Lr19* (г–ж).

а — подустычная везикула, инфекционная гифа и гаусторий в мезофилльной клетке восприимчивого растения (24 ч после инокуляции); б — материнская клетка гаустория и гаусторий в клетке восприимчивого растения (36 ч после инокуляции); в — колония гриба в ткани восприимчивого растения (72 ч после инокуляции); г — подустычная везикула и инфекционная гифа в ткани иммунного растения (24 ч после инокуляции); д — прекращение развития гриба в иммунном растении на стадии материнской клетки гаустория (24 ч после инокуляции); е — недоразвитый гаусторий в клетке иммунного растения (24 ч после инокуляции); ж — отмирание клетки иммунного растения с гаусторием в результате реакции сверхчувствительности (36 ч после инокуляции). га — гаусторий, иг — инфекционная гифа, мк — мезофилльная клетка листа, мкг — материнская клетка гаустория, нк — некротическая клетка, пв — подустычная везикула, тк — тело гаустория, ук — замыкающая клетка устьица, шг — шейка гаустория, я — ядро. Увел.: а, е, ж — об. 90×, ок. 10×; б, в — об. 20×, ок. 10×; г, д — об. 40×, ок. 10×.

рия) и Аралдит (Sigma, Германия); ацетат урана (Serva, США); цитрат свинца, метиленовый голубой азура II и бура  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  («Реахим», Россия).

## Результаты

Гистологические исследования развития паразитического гриба в ткани восприимчивых растений линии с геном *Lr14a* показали, что ПУВ формировали инфекционные гифы, направлявшиеся под небольшим углом к поверхности листа к ближайшим мезофилльным клеткам пшеницы. Цитоплазма перетекала в инфекционные гифы, оставляя пустую оболочку ПУВ (рис. 1, а). На конце ин-

фекционной гифы отчленялась специализированная клетка — материнская клетка гаустория (МКГ), образующая внутри клетки гаустория. В зрелом гаустории выделялись тело и шейка (рис. 1, б). Средний объем гаусториев в восприимчивом растении составлял 127 мкм<sup>3</sup>. Около гаусториев гриба всегда располагалось ядро растения (рис. 1, а). Гифы продолжали рост к следующим клеткам пшеницы, образуя новые гаустории. В результате через 3 сут после инокуляции в ткани листа формировались хорошо развитые колонии с разветвленным мицелием, имеющие в среднем 13,4 гаустория. В зоне колоний не наблюдалось интенсивно окрашенных коллапсированных клеток растения, погибших в результате реакции сверхчувствительности (рис. 1, в). В результате сбалансированного взаимо-

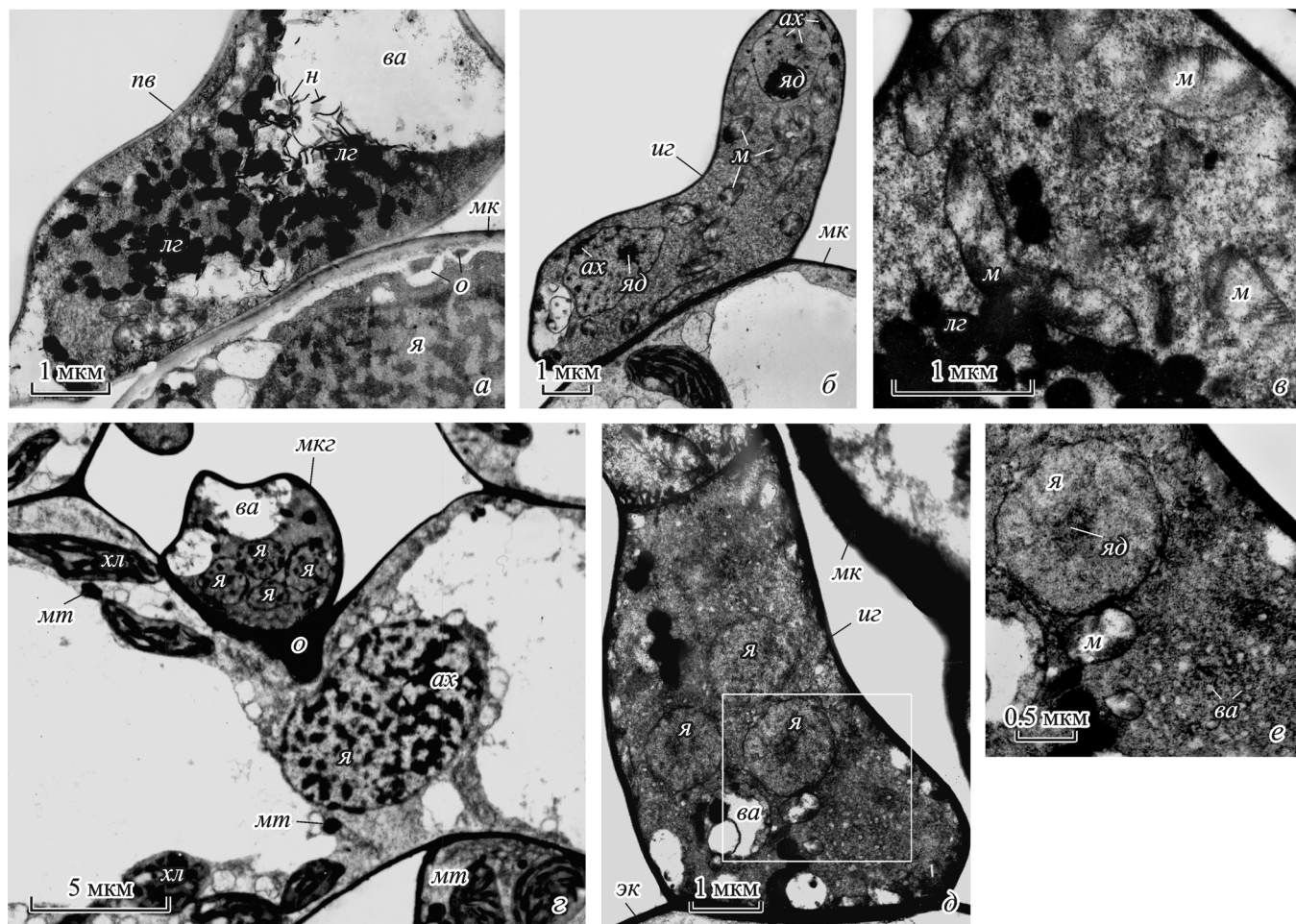


Рис. 2. Взаимодействие *Puccinia triticina* с клетками растений иммунной линии с геном *Lr19* на ранних этапах патогенеза.

*a* — подустычная везикула, прилегающая к мезофилльной клетке растения; *б* — инфекционная гифа; в ядрах (2) маленькие ядрышки (яд) и агрегаты хроматина (ах); *в* — участок инфекционной гифы с разрушенными митохондриями; *г* — структура материнской клетки гаустория и клетки растения после неудачной попытки проникновения гриба; *д* — инфекционная гифа, достигшая нижнего эпидермиса листа; серыйный срез инфекционного места, показанного на рис. 2, *е* — фрагмент инфекционной гифы, изображенной на рис. 2, *д*. *ва* — вакуоль, *лг* — липидная глобула, *м* — митохондрия, *мт* — микротело, *н* — нить, *о* — отложения на клеточной стенке, *хл* — хлоропласт, *эк* — эпидермальная клетка; остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

действия на восприимчивых растениях формировались пустулы со следующей генерацией спор через 6 сут после инокуляции.

В отличие от описанного совместимого взаимодействия в ткани листьев иммунной линии с геном *Lr19* наблюдалось частое нарушение ориентировки инфекционных гиф. Они направлялись под прямыми углом к поверхности растения, минуя мезофилльные клетки растения и не образуя гаусториев, в некоторых случаях достигали нижнего эпидермиса листа (рис. 1, *г*, *д*). В части изученных инфекционных мест (15 %) гриб не был способен проникнуть в клетку и останавливался на стадии первой инфекционной гифы или МКГ. При этом клеточная стенка растения в месте контакта с МКГ была утолщена (рис. 1, *д*). В остальных случаях остановка развития происходила на стадии одного гаустория, преимущественно через 24 ч после инокуляции.

Если в восприимчивых растениях ПУВ оставалась пустой, а инфекционные гифы имели плотную цитоплазму (рис. 1, *а*), то в иммунных растениях значительная часть цитоплазмы оставалась в ПУВ. Цитоплазма инфекционных гиф, за исключением апексов, была разрежена и неравномерна по плотности (рис. 1, *з*, *д*). Объем гаусториев

был в 4.7 раза меньше, чем в контроле (в среднем 27.1 мкм<sup>3</sup>), что свидетельствовало о нарушении их развития (рис. 1, *е*).

На светомикроскопических снимках видно, что ядра клеток растения перемещались в сторону инфекционных структур гриба. Часть ядер иммунного растения приобрела темно-синюю окраску и утратила мелкогранулярную структуру, характерную для ядер клеток восприимчивых растений. Постенный слой цитоплазмы и пластиды, расположенные в зонах контакта с грибом или с клетками растения с гаусториями, были интенсивно окрашены (рис. 1, *з*—*е*). Коллапс клеток растения с внедрившимися гаусториями и разрушение цитоплазмы в результате реакции сверхчувствительности наблюдались преимущественно через 36 ч после инокуляции (рис. 1, *ж*). С течением времени зона некроза расширялась за счет отмирания соседних клеток.

Таким образом, гистологические исследования свидетельствуют о том, что функционирование первых инфекционных структур гриба в тканях иммунных растений и их морфология были существенно нарушены, а остановка развития патогена предшествовала проявлению реакции сверхчувствительности. В связи с этим при исследовании

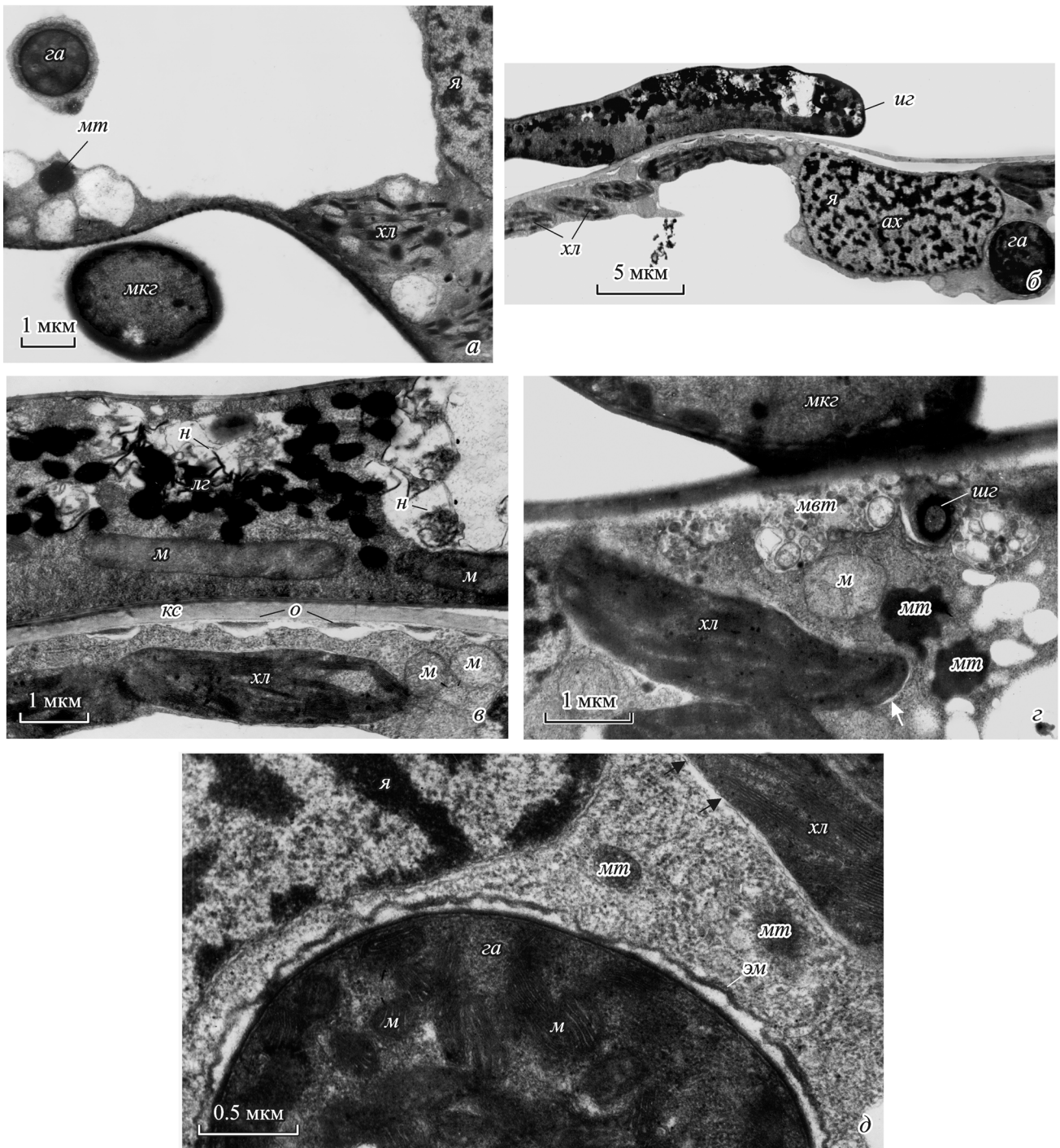


Рис. 3. Строение инфекционных структур *Puccinia triticina* и мезофильных клеток растения с внедрившимися гаусториями. *а* — недоразвитый гаусторий без сопутствующего комплекса органелл и ядра хозяина; *б* — инфекционная гифа и гаусторий в мезофильной клетке; *в* — структура инфекционной гифы и контактирующей клетки растения (фрагмент рис. 3, *б*); *г* — строение цитоплазмы растения рядом с местом проникновения в клетку шейки гаустория; внешняя мембрана хлоропласта разрушающаяся (стрелка), серийный срез инфекционного места, показанного на рис. 3, *б*; *д* — пренекротический гаусторий в клетке растения; внешняя мембрана хлоропласта разрушена (стрелки). *кк* — клеточная стенка растения, *мвт* — мультивезикулярное тело, *эм* — экстрагаусториальная мембрана; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2.

ультраструктурных особенностей взаимодействия основное внимание было сосредоточено на изучении наиболее ранних этапов развития паразита в тканях растений.

В восприимчивых растениях ПУВ и инфекционные гифы гриба имели плотную цитоплазму, включающую в себя рибосомы, цистерны эндоплазматического ретикула, многочисленные митохондрии извитой формы с хорошо развитой системой крист, а также включения липидов

в виде осmioфильных глобул. Крупные ядра гриба содержали диффузный хроматин и большие гранулярные ядрышки (до 50 % объема ядер).

В то же время в иммунных растениях через 24 ч после инокуляции цитоплазма ПУВ и инфекционных гиф гриба имела среднюю плотность, в ней содержались цистерны эндоплазматического ретикула, свободные рибосомы и вакуоли различных размеров. Наиболее заметными эле-

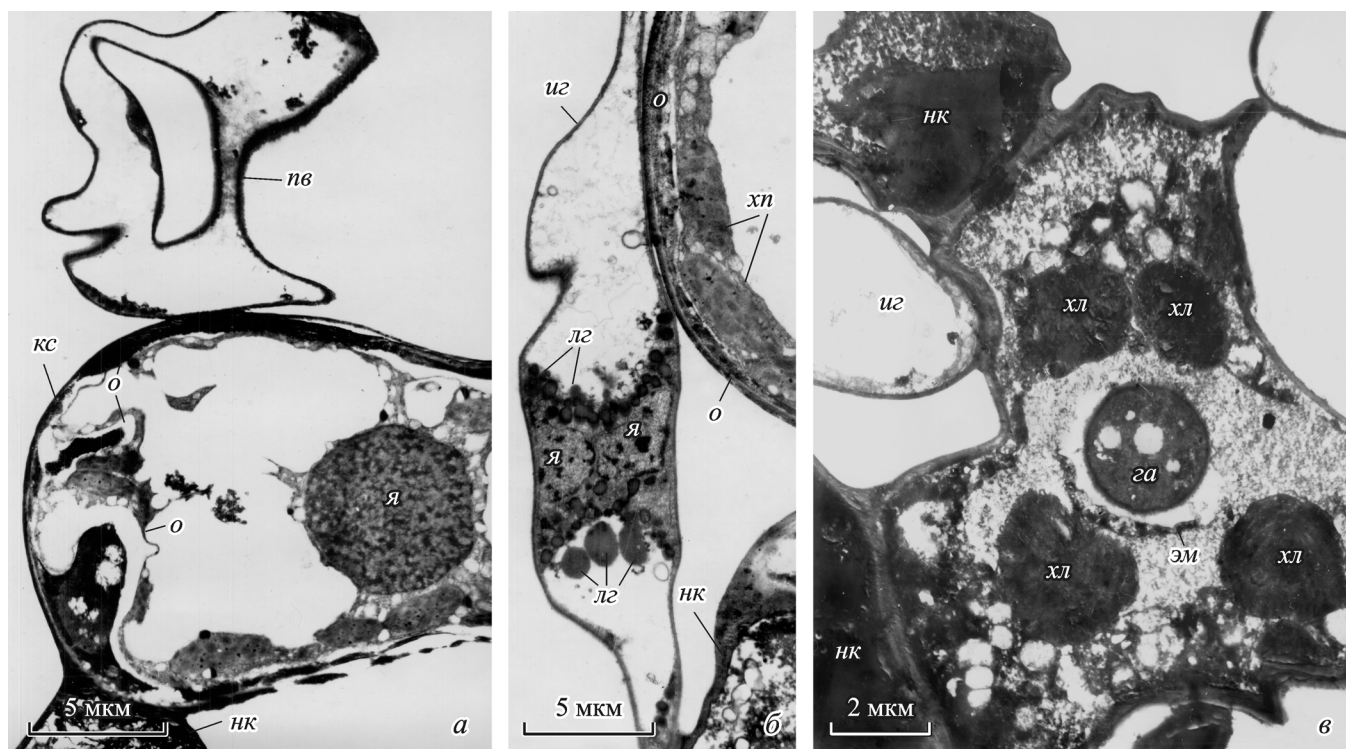


Рис. 4. Строение инфекционных структур гриба и клеток растения на поздних фазах патогенеза (72 ч после инокуляции).

*а* — подустьичная везикула и примыкающая клетка растения с мощными отложениями на клеточной стенке; *б* — вакуолированная инфекционная гифа; *в* — гаусторий в коллапсированной некротической клетке растения; экстрагаусториальная мембрана разорвана. *кс* — клеточная стенка растения; остальные обозначения те же, что и на рис. 1—3.

ментами цитоплазмы были запасные питательные вещества в виде осмиофильных липидных глобул. В отличие от совместимой комбинации в цитоплазме ПУВ и инфекционных гиф наблюдались необычные толстые осмиофильные нити (рис. 2, *а*; 3, *в*). Митохондрии гриба несли признаки дезорганизации: увеличенный объем, просветленный матрикс, кристы были погружены в электронно-плотное вещество, у части митохондрий была разрушена внешняя мембрана (рис. 2, *б*, *в*). Клетки гриба бинуклеарны, в ядрах наблюдались крупные агрегаты хроматина, часто прикрепленные к мембране. Ядрышки имели фибриллярную структуру и небольшой объем (в среднем 12.4 % объема ядра) (рис. 2, *б*).

На клеточных стенках растения, контактировавших с ПУВ и инфекционными гифами, наблюдались очаговые отложения электронно-плотного вещества и отхождение плазматической мембраны от стенки. Мембраны растения теряли четкость, кариоплазма приобретала повышенную плотность (рис. 2, *а*; 3, *б*).

На рис. 2, *з—е* представлены особенности структуры партнеров при остановке развития гриба на стадии инфекционных гиф или МКГ. МКГ содержали четыре ядра с крупными агрегатами хроматина, в их цитоплазме наблюдались крупные вакуоли (рис. 2, *з*). В месте неудачной попытки внедрения гриба в мезофилльную клетку наблюдалось крупное отложение электронно-плотного материала. Хотя клетка растения не проявляла признаков реакции сверхчувствительности, кристы митохондрий были разрушены, в строении хлоропластов отмечались овальные светлые участки. В отличие от типичного для ядер восприимчивых растений равномерного распределения хроматиновых районов в ядре данной клетки были обнаружены необычные крупные агрегаты хроматина. В цитоплаз-

ме клетки, контактирующей с МКГ, а также соседних с ней клеток наблюдалось значительное количество микротел с высокой электронной плотностью (рис. 2, *з*). Серийный срез того же инфекционного места показывает структуру клетки гифы, достигшей нижнего эпидермиса листа. Митохондрии гриба дезорганизованы, в цитоплазме содержится множество мелких вакуолей, ядрышки в ядрах имели фибриллярную структуру (рис. 2, *д*, *е*).

В других инфекционных местах гриб образовывал один карликовый гаусторий в мезофилльной клетке листа (рис. 3, *а*, *б*). В большинстве случаев внедрение гаустория не стимулировало таксиса к нему ядра и образования комплекса цитоплазматических органелл (рис. 3, *а*), характерного для взаимодействия с восприимчивыми растениями (рис. 1, *а*, *б*). В гаусториях не обнаруживалось ядра. Цитоплазма отличалась высокой электронной плотностью, органеллы были плохо различимы, что свидетельствовало о пренекротическом состоянии клеток (рис. 3, *а*, *д*). На экстрагаусториальной мембране, окружающей тело гаустория, наблюдались отложения электронно-плотного вещества (рис. 3, *д*).

В некоторых случаях агрегат цитоплазмы и ядро присутствовали рядом с гаусторием, однако клетка растения демонстрировала множественные признаки нарушений. В ядре растения была повышена плотность кариоплазмы, наблюдались крупные агрегаты хроматина (рис. 3, *б*). В месте внедрения гаустория в клетку присутствовали микротела, вокруг шейки гаустория наблюдались достаточно мощные мультивезикулярные тела растения (рис. 3, *з*).

В клетках, контактирующих со структурами гриба, наблюдались серьезные нарушения фотосинтезирующего аппарата: объем хлоропластов уменьшался, электронная

плотность стромы сильно увеличивалась, в некоторых ее районах наблюдались овальные просветления, внешние мембраны пластид разбухали, иногда разрушались (рис. 2, *г*; 3, *в—д*).

На более поздних стадиях патогенеза наблюдалась сильная дезорганизация клеток обоих организмов. Через 72 ч после инокуляции ПУВ гриба были коллапсированы и вакуолизированы. Цитоплазма в них была представлена тонким постенным слоем с небольшим количеством липидных глобул (рис. 4, *а*). Клетки межклеточного мицелия были вакуолизированы, остатки цитоплазмы сосредоточены в районе ядер. Ядра гриба имели маленькие угловатые по форме ядрышки и содержали крупные агрегаты хроматина (рис. 4, *б*). В цитоплазме наблюдалось большое количество липидных глобул высокой и средней электронной плотности, в то время как при развитии гриба в восприимчивых растениях липиды исчезали из ПУВ и инфекционных гиф уже через 36 ч после инокуляции.

Клетки растения с внедрившимися гаусториями погибали в результате реакции сверхчувствительности через 36—72 ч после инокуляции. Гаустории гриба в них имели плотную цитоплазму, органеллы были неразличимы, экстрагаусториальная мембрана разрушена (рис. 4, *в*). На более поздних этапах разрушались как гаустории, так и МКГ. В клетках растения разрывался тонопласт центральной вакуоли, органеллы приобретали высокую электронную плотность, позже все содержимое клетки становилось однородно темным (рис. 4, *в*).

Клетки растения, контактировавшие с дезорганизованными инфекционными структурами гриба и собственными некротическими клетками, имели мощные отложения на клеточной стенке в виде толстого неоднородного по структуре слоя или мощных образований нерегулярной формы. Как правило, отложения имели комбинированную структуру: в светлый материал были включены многочисленные электронно-плотные включения (рис. 4, *а, б*). Изменялся вид ядер растений: кариплазма становилась более темной, мембрана — размытой. Хлоропласты принимали угловатую форму, их электронная плотность увеличивалась (рис. 4, *а, б*).

## Обсуждение

Выявление клеточных механизмов действия высокоэффективных генов устойчивости, длительно защищающих растения от быстро эволюционирующих ржавчинных грибов, представляет интерес как для развития теории иммунитета, так и для практической защиты сельскохозяйственных культур. Ген устойчивости *Lr19* был перенесен в геном мягкой пшеницы с помощью межродовой гибридизации от иммунного вида пырея удлиненного *Agropyron elongatum* (Host) Beauv. (Knott, 1961). В течение нескольких десятилетий он остается эффективным против популяций патогенного гриба в различных зонах мира и многих регионах России (Mesterhazy et al., 2000; Gultyaeva et al., 2001).

В настоящее время считается, что воздействие растений, приводящее к ингибированию ржавчинных грибов на стадиях первых инфекционных структур (инфекционной гифы или первого гаустория), характерно для видовой иммунитеты и определяется полигенными системами видов. Такие результаты продемонстрированы ранее при попытках заражения неспециализированными паразитами растений-нехозяев: возбудителем стеблевой ржавчины

пшеницы *Puccinia graminis tritici* — кукурузы, возбудителем ржавчины вигны *Uromyces phaseoli var. vignae* — бобов, капусты и кукурузы (Leath, Rowell, 1966; Heath, 1977). В то же время подавление развития гриба на более поздних этапах взаимодействия, сопровождающееся отмиранием клеток растения, считается характерным для моногенной расоспецифической устойчивости сортов (Андреев, Плотникова, 1989; Prell, Day, 2000).

При электронно-микроскопическом изучении взаимодействия иммунных сортов вигны с *U. phaseoli var. vignae* и иммунных линий льна с *Melampsora lini* было выявлено очень быстрое отмирание пораженных клеток растений, вслед за которыми отмирали гаустории гриба (Heath, Heath, 1971; El-Gewely et al., 1972; Heath, 1972).

Другие исследователи изучали взаимодействие ржавчинных грибов с растениями в более совместимых комбинациях с визуальными симптомами болезни в виде некротических пятен. В силу технических сложностей выявления в ткани единичных инфекционных структур и пораженных клеток растений ультраструктурные исследования проводились на поздних стадиях патогенеза (3—10 сут после инокуляции), когда развивались достаточно крупные колонии грибов, окруженные зоной некротических клеток растений. При этом не наблюдалось существенных изменений в структуре клеток мицелия грибов, но отмечались изменения структуры гаусториального аппарата: увеличение электронной плотности как МКГ, так и гаусториев, разбухание митохондрий в гаусториях и разрушение экстрагаусториальной мембраны (Van Dyke, Hooker, 1969; Coffey, 1976; Harder et al., 1979). В клетках устойчивых растений отмечались более быстрая утилизация крахмала в хлоропластах, разрушение плазмалеммы и нарушение структуры хлоропластов; затем наступали коллапс клеток и разрушение их органелл (Coffey, 1976; Harder et al., 1979; Mims et al., 2002). Таким образом, в данных комбинациях механизмы сортового иммунитета проявлялись после внедрения гаусториев в клетки растений и сопровождалась реакцией сверхчувствительности.

Ультраструктурные особенности проявления иммунитета растений-нехозяев при заражении ржавчинными грибами ранее были изучены только одним автором (Heath, 1972, 1974). При этом изменения структуры инфекционных гиф и гаусториев отмечались после контакта с клетками растений.

Проведенные нами гистологические и электронно-микроскопические исследования показали, что в растениях пшеницы, несущих ген *Lr19*, патоген останавливается в развитии на стадиях инфекционной гифы или первого гаустория в клетке, что аналогично взаимодействию *P. tritici* с видами-нехозяевами (Плотникова и др., 2005б).

Нами впервые выявлен ряд особенностей клеточного взаимодействия, проявляющихся до внедрения паразита в клетку растения. По нашим наблюдениям, уже на стадии формирования ПУВ и первых инфекционных гиф происходили серьезные нарушения структуры клеток патогена. В отличие от контроля в иммунных растениях ядра клеток гриба содержали крупные агрегаты хроматина, объем их ядрышек был в 4.7 раза меньше, чем в совместимой комбинации. Во всех инфекционных структурах гриба митохондрии были дезорганизованы и частично разрушены. Утилизация энергетических запасов спор происходила не полностью, рядом с липидными глобулами обнаружены осмиофильные нити с неясными функциями. Цитоплазма гриба имела меньшую электронную плотность,

чем в совместимых комбинациях, происходила ранняя вакуолизация клеток. Наблюдения, свидетельствующие о раннем нарушении структуры и функций клеток *P. tritici-na*, подтверждаются полученными ранее данными о частичном подавлении формирования аппрессориев и нарушении проникновения гриба в подустыичную полость растений данной линии (Плотникова и др., 2005а).

В настоящее время известно, что при успешном взаимодействии ржавчинного гриба с восприимчивым растением последовательно индуцируется экспрессия десятков генов, необходимых для развития гриба и обеспечения биотрофных взаимоотношений с хозяином (Mendgen, Hahn, 2002). Можно предположить, что наблюдавшиеся нами крупные агрегаты гетерохроматина в ядрах ПУВ и инфекционных гиф являются признаками нарушения функционирования генома паразита вследствие отсутствия стимуляции развития или фунгицидного действия иммунных растений. Разрушение митохондрий первых инфекционных структур гриба также указывает на экспрессивный защитный механизм растений, проявляющийся до внедрения патогена в клетку растения.

Вероятно, следствием морфологических нарушений и подавления ряда функций клеток гриба были дезориентация инфекционных гиф в ткани листа, подавление способности образовать гаустории либо образование дефектных безъядерных гаусториев, не способных эффективно взаимодействовать с клетками растений. Обнаруженные нами мощные отложения электронно-плотного вещества в месте неудачной попытки внедрения паразита в мезофилльную клетку были аналогичны отложениям, наблюдавшимся при взаимодействии ржавчинного гриба *U. phaseoli* var. *vignae* с фасолью. Подавление миграции ядер гриба также наблюдалось при образовании гаусториев неспециализированного гриба *U. phaseoli* var. *typica* в растениях вигны (Heath, 1972, 1974).

Если в приведенных выше экспериментах (Heath, 1972, 1974), как правило, не отмечалось изменений структуры клеток растений, то в наших опытах наблюдались быстрые реакции мезофилльных клеток на контакт с ПУВ и первой инфекционной гифой паразита. Наиболее типичными были снижение четкости мембран; увеличение электронной плотности кариоплазмы и реорганизация хроматина ядра с образованием крупных агрегатов; изменения формы и структуры хлоропластов и их частичная дезорганизация; отложения различной структуры на клеточных стенках растения. Поскольку ранее было установлено, что основная часть ПУВ образуется через 18 ч после инокуляции, а через 24 ч гриб формирует первые гаустории в клетках растений (Плотникова и др., 2005б), можно говорить о том, что наблюдавшиеся нами изменения клеток растения происходили в 1-е ч контакта со структурами гриба и усиливались со временем. Реакция сверхчувствительности проявлялась позже (через 36 ч после инокуляции и более) и, вероятно, являлась следствием предшествующего нарушения взаимодействия.

В связи с этим встает вопрос о потенциальных механизмах иммунитета, развивающихся в течение нескольких часов после проникновения гриба в ткань растений и приводящих к существенной дезорганизации структуры клеток обоих партнеров. В настоящее время установлено, что самая быстрая иммунная реакция растения в ответ на узнавание элиситоров патогена — накопление активных форм кислорода; она проявляется уже через 5—10 мин после контакта с элиситором (Jabs, Slusarenko, 2000). В результате окислительного взрыва происходит полиме-

ризация фенолов и появляются электронно-плотные отложения лигнина на клеточных стенках растений. Известно, что активные формы кислорода являются важным звеном в развитии реакции сверхчувствительности, при их действии происходит окисление липидных мембран, которое приводит к дезорганизации структур клетки и ее коллапсу (Rusterucci et al., 1996; Kombrink, Schmelzer, 2001). Кроме того, активные формы кислорода являются мощным антисептическим механизмом растений и способны разрушать мембраны микроорганизмов (Jabs, Slusarenko, 2000). Другим экспрессивным механизмом растений является синтез защитных PR-белков. Известно, что часть из них экспрессируется уже через 3—6 ч после узнавания патогена (Hedrick et al., 1988).

В наших экспериментах в пользу окислительного взрыва свидетельствовали плотные очаговые отложения на стенках растительных клеток, соседствующих с инфекционными структурами патогена, а также нарушение четкости клеточных мембран и разрушение хлоропластов. Действием активных окислителей можно объяснить наблюдавшуюся нами дезорганизацию митохондрий в гифах паразитического гриба, а также пренекротический вид образованных дефектных гаусториев.

Таким образом, полученные данные показывают, что ген устойчивости *Lr19*, перенесенный в геном пшеницы из рода *Agropyron*, обеспечивает защиту с помощью клеточных механизмов, сходных с проявлениями видового иммунитета, но отличных от сортов устойчивости. Эти результаты особенно интересны с точки зрения сохранения длительной эффективности гена. Можно предположить, что мутации в геноме *P. tritici-na*, приводящие к преодолению описанных механизмов устойчивости, существенно снижают приспособленность гриба, вследствие чего не накапливаются в популяциях.

#### Список литературы

- Андреев Л. Н., Плотникова Ю. М. 1989. Ржавчина пшеницы: Цитология и физиология. М.: Наука. 304 с.
- Бирюзова В. И., Боровягин В. Л., Гилев В. П. и др. 1963. Электронномикроскопические методы исследования биологических объектов. М.: Изд-во АН СССР. 204 с.
- Михайлова Л. А., Квитко К. В. 1970. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm. Микология и фитопатология. 4 : 269—273.
- Плотникова Л. Я., Кнауэс Ю. К., Мешкова Л. В. и др. 2005а. Механизмы проявления эффективных генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине. Пути мобилизации биологических ресурсов повышения продуктивности пашни, энергоресурсосбережения и производства конкурентоспособной сельскохозяйственной продукции: Матер. Всерос. научно-практ. конф., посвящ. 85-летию ТатНИИСХ и 1000-летию Казани (Казань, 5—6 июля 2005 г.). Казань. 656—670.
- Плотникова Л. Я., Шаманин В. П., Кнауэс Ю. К. и др. 2005б. Механизмы иммунитета к бурой ржавчине пшеницы видов-нехозяев, зерновых культур и линий пшеницы с интрогрессированными генами устойчивости. Фитосанитарное оздоровление агроэкосистем: Матер. II Всерос. съезда по защите растений (5—10 декабря 2005 г.). СПб. 537—540.
- Санин С. С. 1997. Фитосанитарный мониторинг: современное состояние и пути совершенствования. В кн.: Проблемы оптимизации фитосанитарного состояния растениеводства. Сб. тр. Всерос. съезда по защите растений (СПб., декабрь 1995). СПб. 166—176.
- Coffey M. D. 1976. Flax rust resistance involving the *K* gene: an ultrastructural survey. Can. J. Bot. 54 : 1443—1457.

- El-Gewely M. R., Smith W. E., Colotelo N. 1972. The reaction of near-isogenic lines of flax to the rust fungus *Melampsora lini*. 1. Host-parasite interface. *Can. J. Genet. Cytol.* 14 : 743—751.
- Gulyaeva K., Mikhailova L., Walther U., Kapalinke D. 2001. Comparison of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* populations in Germany, Austria, Russia and Ukraine in 2000. In: Proc. of Conf. «Sustainable system of cereal crop protection against fungal diseases as a way of reduction of toxin occurrence in food». Kromerizh, 2001. Kromerizh. 175—178.
- Harder D. E., Samborski D. J., Rohringer R., Rimmer S. R., Kin W. K. 1979. Electron microscopy of susceptible and resistant near-isogenic (*sr6/Sr6*) lines of wheat infected by *Puccinia graminis tritici*. III. Expression of incompatible interactions. *Can. J. Bot.* 57 : 2626—2634.
- Heath M. C. 1972. Ultrastructure of host and nonhost reactions to cowpea rust. *Phytopathology.* 62 : 27—38.
- Heath M. C. 1974. Light and electron microscope studies of the interactions of host and nonhost plants with cowpea rust — *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Physiol. Plant Pathol.* 4 : 403—414.
- Heath M. C. 1977. A comparative study of non-host interactions with rust fungi. *Physiol. Plant. Pathol.* 10 : 73—88.
- Heath M. C., Heath I. B. 1971. Ultrastructure of an immune and susceptible reaction of cowpea leaves to rust infection. *Physiol. Plant Pathol.* 1 : 277—287.
- Hedrick S. A., Bell J. N., Lamb C. J. 1988. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *Plant Physiol.* 86 : 182—186.
- Jabs T., Slusarenko A. J. 2000. The hypersensitive response. In: Mechanisms of resistance to plant diseases. The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 279—324.
- Juniper B. B., Cox A. C., Gilchrist A. J., Williams P. R. 1970. Techniques for plant electron microscopy. Oxford: Oxford Univ. Press. 256 p.
- Knott D. R. 1961. The inheritance of rust resistance. VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat. *J. Plant Sci.* 41 : 109—123.
- Kombrink E., Schmelzer E. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 107 : 69—78.
- Leath K. T., Rowell L. J. 1966. Histological study of resistance of *Zea mays* to *Puccinia graminis*. *Phytopathology.* 56 : 1305—1309.
- Mains E. B., Jackson E. S. 1926. Physiological specialization in the leaf rust wheat *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology.* 16 : 89—120.
- Mendgen K., Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Sci.* 2 : 1360—1385.
- Mesterhazy A., Bartos P., Goyean H., Niks R. E., Csosr M. 2000. European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie.* 20 : 793—804.
- Mims C. W., Rodriguez-Lothar C., Richardson E. A. 2002. Ultrastructure of the host-pathogen interface in day-lily leaves infected by the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma.* 219—221.
- Prell H. H., Day P. R. 2000. Plant-fungal pathogen interaction: a classical and molecular view. Berlin etc.: Springer-Verlag. 214 p.
- Raynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1 : 208—212.
- Rusterucci C., Stallaert V., Milat M.-L., Pugin A., Ricci P., Blein J.-P. 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111 : 885—891.
- Van Dyke C. C., Hooker A. L. 1969. Ultrastructure of the host and parasite in interactions of *Zea mays* with *Puccinia sorghi*. *Phytopathology.* 59 : 1934—1946.

Поступила 6 II 2007

CELLULAR FEATURES OF IMMUNE REACTION OF COMMON WHEAT  
WITH *Lr19* GENE TO BROWN RUST FUNGUS INFECTION

L. Ya. Plotnikova

Department of Plant Breeding, Genetics and Plant Physiology, Omsk State Agrarian University;  
e-mail: LPlotnikova@rambler.ru

The effect of resistant gene *Lr19* on the development of brown rust fungus *Puccinia triticina* in the immune line of Thatcher variety was similar to that of nonhost species. The development of the fungus was inhibited in the plant tissue at the early stages. The fungus cells demonstrated structural disorganization of the nuclei and mitochondria before host cell invasion. The plant cell membranes and chloroplasts were changed; large chromatin aggregates appeared in their nuclei. Hypersensitive reaction developed after inhibition of the fungus.

Key words: immunity, histology, cell ultrastructure, *Triticum aestivum*, *Puccinia triticina*, hypersensitivity.