

## ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ-НЕХОЗЯЕВ НА РАЗВИТИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР РЖАВЧИННЫХ ГРИБОВ

© Л. Я. Плотникова

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

Паразитические ржавчинные грибы *Puccinia triticina* и *P. coronata*, специализированные к видам злаков, не способны формировать полноценные по функциям клеточные структуры (ростковые трубки и аппрессории) на поверхности видов, не входящих в семейство Poaceae. Развитие структур грибов в различной степени индуцируется поверхностными свойствами листьев злаков — проса, кукурузы, овса и мягкой пшеницы. На поверхности видов-нехозяев нарушаются деление и активность ядер паразитов. Внедрение грибов в подустьичные полости листьев предотвращается преимущественно окислительным взрывом, в меньшей степени — защитными белками.

Ключевые слова: клеточные структуры, *Puccinia triticina*, *P. coronata*, видовой иммунитет, окислительный взрыв, PR-белки.

Возбудители ржавчинных болезней — специализированные паразитические организмы, взаимодействующие с растениями на клеточном и молекулярном уровнях. Эти патогены способны развиваться на ограниченном круге видов растений, которые становятся для них хозяевами, в то время как остальные растения не поражаются и являются для них видами-нехозяевами (Prell, Day, 2000). В частности, возбудитель бурой ржавчины *Puccinia triticina* наиболее сильно поражает основную зерновую культуру — мягкую пшеницу *Triticum aestivum*, возбудитель корончатой ржавчины *P. coronata* — овес *Avena sativa*, в то время как большинство остальных видов к ним иммунно.

Поскольку видовой иммунитет защищает растения от патогенов в течение длительного времени, он является предметом пристального внимания исследователей (Nath, 2000). Представление о клеточных и физиологических особенностях взаимодействия ржавчинных грибов с иммунными видами имеет важное значение как для понимания эволюции паразитизма в природных сообществах, так и для эффективной защиты культурных растений.

Целью работы было изучение влияния свойств поверхности растений и индуцированных физиологических механизмов (генерация активных форм кислорода и экспрессия защитных белков) иммунных видов на развитие клеточных структур ржавчинных грибов.

### Материал и методика

Использованы листья взрослых растений бегонии клубневой *Begonia tuberhybrida*, сингониума ножколистного *Syngonium podophyllum*, розы группы флорибунда *Rosa floribunda*, хлорофитума хохлатого *Chlorophytum comosum* и лука посевного *Allium cepa*. Листья растений семейства Мятликовые Poaceae были взяты от 30-суточных

проростков кукурузы *Zea mays* и 10-суточных проростков мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, овса *Avena sativa* и проса *Panicum miliaceum*.

Отрезки листьев растений заражали моноспорным инокулятом урединиоспор возбудителей бурой ржавчины пшеницы *Puccinia triticina* Erikss. и корончатой ржавчины овса *P. coronata* Corda. Жизнеспособность инфицированных листьев поддерживали 0.004%-ным раствором бензимидазола. В качестве контроля служили инфицированные листья восприимчивых растений-хозяев — мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 и овса сорта Тарский 2.

Листья фиксировали через 12, 16, 48 и 72 ч после инокуляции в лактофенольной смеси, содержащей фенол, молочную кислоту, глицерин, дистиллированную воду и этиловый спирт в соотношении 1 : 1 : 1 : 1 : 8. Клеточные структуры грибов на поверхности и в тканях выявляли путем окрашивания целых листьев 1%-ным красителем анилиновым синим в лактофеноле и последующей дифференциации окраски в насыщенном растворе хлоралгидрата. Клетки растений, погибшие при внедрении гаусториев в результате реакции сверхчувствительности, выявляли по коллапсу и интенсивной синей окраске.

Для изучения особенностей клеточных структур грибов на поверхности растений препараты окрашивали 0.1%-ным водным раствором красителя проционового синего, дающего специфическую синюю окраску на белки (Ivanov, 1987). ДНК и РНК в фиксированном материале окрашивали 0.01%-ным акридиновым оранжевым в цитрат-фосфатном буферном растворе, рН 5.6. При наблюдениях использовали возбуждающий световый фильтр с диапазоном 450—480 нм и запирающий фильтр с диапазоном 530—640 нм (Зеленин, 1967).

Активные формы кислорода выявляли через 12, 16 и 20 ч после инокуляции путем витального окрашивания

листьев нитросиним тетразолием по модифицированному методу (Heath, 1998). Для этого проводили вакуум-инфильтрацию кусочков инфицированных листьев 0.1%-ным раствором красителя в дехлорированной водопроводной воде, через 30 мин материал фиксировали в лактофеноле. Краситель образует в присутствии и супероксид-аниона  $O_2^{\bullet-}$  нерастворимое синее соединение.

Для подавления окислительного взрыва растения обрабатывали специфическим ингибитором кальциевых каналов верапамилом по модифицированной методике (Хи, Heath, 1998). Концы отрезков листьев помещали в 0.01%-ный водный раствор верапамила на 8—20 ч. Подавление биосинтеза белка в клетках растений проводили водными растворами актиномицина Д (5 мг/мл) и циклогексимида (2.5 мг/мл) по модифицированной методике (Heath, 1979). Концы отрезков листьев помещали в растворы ингибиторов на 30 мин, для опытов использовали верхние части листьев, не контактировавшие с раствором. Инокуляцию листьев спорами проводили через 8 ч после обработки ингибиторами кальциевых каналов и биосинтеза белка.

Развитие возбудителей ржавчины на поверхности и в тканях целых листьев изучали с помощью светового микроскопа МБИ-15 и люминесцентного микроскопа Люмам-5. Микрофотосъемку проводили цифровой фотокамерой марки Olympus SP-320 (разрешение 7 мегапикселей на 1 дюйм). В каждой комбинации изучали прорастание и развитие инфекционных структур 350—400 спор на 6 растениях (в двух повторностях по 3 растения).

Реактивы: акридиновый оранжевый, анилиновый голубой и циклогексимид (Sigma, Германия); актиномицин Д (Serva, США); верапамил (Calbiochem, США); нитросиний тетразолий, проционовый синий (Procion blue NB) и хлоралгидрат (Acros, США).

## Результаты

Споры изученных паразитов различаются по форме: у возбудителей бурой ржавчины пшеницы *Puccinia triticina* они округлые, а у возбудителя корончатой пшеницы овса *P. coronata* — овальные. Несмотря на таксономические и морфологические различия, изученные грибы образовывали на поверхности листьев ряд сходных по виду и функциям клеточных структур, необходимых для инфицирования растений. После попадания инокуляма на листья восприимчивых сортов видов-хозяев споры прилипали к поверхности, основная их часть (93—95 %) прорастала, образуя ростковые трубки, направлявшиеся к устьицам. Ростковые трубки *P. triticina* располагались как перпендикулярно проводящим пучкам, так и под небольшим углом к ним (рис. 1, а), а для *P. coronata* были характерны перпендикулярное пучкам расположение ростковых трубок и формирование утолщений над антиклинальными стенками эпидермальных клеток. На листьях растений-хозяев 85—90 % ростковых трубок формировали специализированные структуры — аппрессории, обеспечивающие проникновение в ткань растений; при этом основная часть аппрессориев (88—93 %) располагалась на устьицах, что свидетельствует об эффективном узнавании их специализированными паразитами. Цитоплазма аппрессориев перетекала в подустыичные везикулы в подустыичных камерах листьев, а затем в инфекционные гифы, при этом на поверхности листа оставались пустые оболочки аппрессориев (рис. 1, а). Инфекционные гифы

*P. triticina* и *P. coronata* направлялись в ткани листьев, на их концах формировались специализированные материнские клетки гаусториев, а также гаустории, поглощающие вещества из клеток растений. Уже через 2 сут в листьях восприимчивых растений пшеницы и овса формировался разветвленный мицелий, имеющий 3—4 гифы и 2—3 гаустория (рис. 1, б).

Развитие специализированных паразитов на поверхности растений, принадлежащих к далеким в филогенетическом отношении от злаков родам, было изучено на примере возбудителя бурой ржавчины пшеницы *P. triticina*. При развитии гриба на листьях растений класса Двудольные — сингониума ножколистного *Syngonium podophyllum* и бегонии клубневой *Begonia tuberhybrida* — прорастание спор было достоверно ниже, чем в контроле (76—79 % проросших спор); при этом на поверхности отмечались, как правило, только пустые оболочки проросших спор и одиночные ростковые трубки. Вероятно, ростковые трубки не прилипали к поверхности и отрывались во время фиксации и окрашивания препаратов. На листьях розы прикрепление ростковых трубок гриба происходило нормально, однако они были необычно длинными и тонкими. На поверхности листьев сингониума, бегонии и розы ростковые трубки проходили мимо устьиц, не образуя аппрессориев (рис. 1, в).

Характерной чертой клеток эпидермиса листьев видов класса Однодольные были вытянутые очертания, но форма клеток, а также особенности строения и плотность расположения устьиц зависели от видовой принадлежности. На листьях растений семейства Liliaceae — хлорофитуме хохлатом *Chlorophytum comosum* и луке посевном *Allium cepa* — интенсивность прорастания спор существенно не отличалась от контроля, ростковые трубки плотно прилипали к поверхности. Однако на хлорофитуме длинные и тонкие ростковые трубки гриба ориентировались произвольно, не образовывали аппрессориев (рис. 1, г). На листьях лука ростковые трубки часто направлялись поперек проводящих пучков и образовывали небольшое количество аппрессориев (5.2 % от количества ростковых трубок), при этом лишь половина аппрессориев располагалась на устьицах, остальные — на поверхности эпидермальных клеток. Аппрессории имели малый объем и неправильную лопастную форму, проникновения в устьица не отмечалось (рис. 1, д, е).

Особенности взаимодействия ржавчинных грибов с видами-хозяевами семейства злаков Poaceae изучали на примере двух патогенов — *P. triticina* и *P. coronata*. Прорастание спор грибов на листьях иммунных видов не отличалось от контроля, наблюдалась нормальная адгезия ростковых трубок к поверхности листьев, но дальнейшее развитие зависело от вида растений. На листьях кукурузы ростковые трубки грибов, имеющие нормальный диаметр, росли преимущественно перпендикулярно продольным стенкам клеток (рис. 1, ж). На листьях проса часть ростковых трубок росла в произвольном направлении, диаметр их был меньше, чем на поверхности вида-хозяина (рис. 1, з). В отличие от видов-хозяев на просе и кукурузе грибы формировали мало аппрессориев (рис. 2), значительная их доля располагалась на эпидермальных клетках, что свидетельствует о недостаточно эффективном узнавании устьиц. Аппрессории на устьицах проса и кукурузы были малого размера и преимущественно лопастной формы (рис. 1, з, к). Цитоплазма аппрессориев *P. coronata* на листьях кукурузы имела малую плотность, с помощью специфического красителя на белки проционового

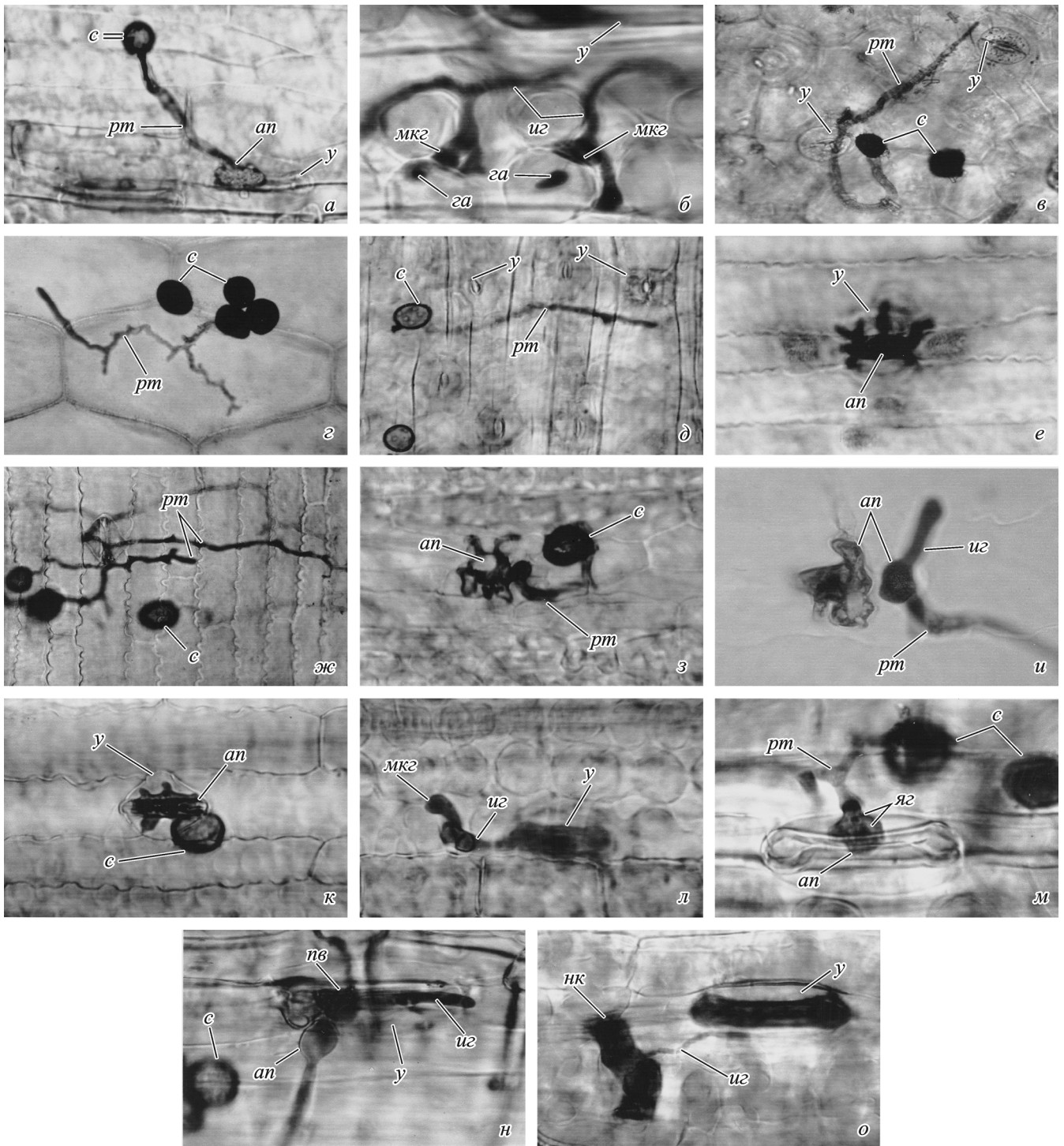


Рис. 1. Развитие клеточных структур ржавчинных грибов *Puccinia triticina* и *P. coronata* на листьях видов-хозяев (а–б) и видов-нехозяев (в–о).

а — проросшая спора *P. triticina* и аппрессорий на устьице мягкой пшеницы (12 ч после инокуляции); б — колония *P. triticina* в ткани листа мягкой пшеницы (48 ч после инокуляции); в — развитие *P. triticina* на листе бегонии, ростковая трубка проходит мимо устьица; г — тонкая ветвистая ростковая трубка *P. triticina* на листе хлорофитума; д — развитие *P. triticina* на листе лука, длинные ростковые трубки прошли перпендикулярно антиклинальным стенкам эпидермальных клеток; е — аппрессорий *P. triticina* лопастной формы на устьице лука; ж — перпендикулярная антиклинальным стенкам эпидермальных клеток ориентация ростковых трубок *P. triticina* на кукурузе; з — инфекционные структуры *P. coronata* на листе проса, аппрессорий имеет лопастную форму, цитоплазма вакуолизована; и — аппрессории *P. coronata* на устьице кукурузы, цитоплазма левого аппрессория сильно вакуолизована, правый аппрессорий образовал инфекционную гифу на поверхности листа, окраска проционовым синим; к — аппрессорий *P. triticina* лопастной формы на устьице кукурузы; л — инфекционная гифа и материнская клетка гаустория *P. triticina* в листе кукурузы; м — аппрессорий *P. triticina* с двумя ядрами на устьице листа овса; н — клеточные структуры *P. triticina* на поверхности и в подустьичной полости листа овса (48 ч после инокуляции); о — инфекционная гифа *P. coronata* и мезофильная клетка пшеницы, погибшая при внедрении гаустория (48 ч после инокуляции). Увел.: а, г, д, ж — об. 20×, ок. 15×; б, в, е, з, и–л, н, о — об. 40×, ок. 15×; м — об. 70×, ок. 15×. ап — аппрессорий, га — гаусторий, из — инфекционная гифа, мкз — материнская клетка гаустория, нк — некротическая клетка растения, пв — подустьичная везикула, pt — ростковая трубка, с — спора, у — устьице, яг — ядро гриба.

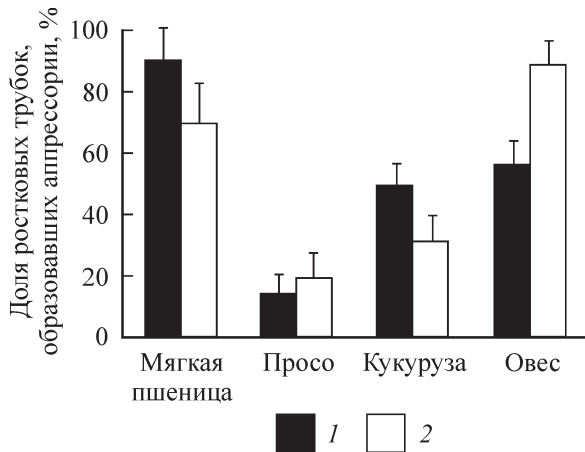


Рис. 2. Интенсивность формирования аппрессориев ржавчинными грибами *Puccinia triticina* (1) и *P. coronata* (2) на листьях злаков.

синего выявлены ее неоднородность и сильная вакуолизация клеток (рис. 1, *u*). Внедрения грибов в устьица проса не наблюдалось, а в листья кукурузы проникал только возбудитель бурой ржавчины *P. triticina* (11 % инфекционных мест), при этом его аппрессории имели овальную форму. Как правило, гриб образовывал одну инфекционную гифу, в очень редких случаях (1.5 % инфекционных мест) развивались округлые материнские клетки гаусториев, однако попыток формирования гаусториев и отмирания при этом клеток растений не наблюдалось (рис. 1, *l*).

В комбинациях «*P. triticina* — овес» и «*P. coronata* — мягкая пшеница» паразиты развивались более успешно.

На листьях образовывалось значительное количество аппрессориев, хотя их было в 1.3—1.6 раза меньше, чем на видах-хозяевах (рис. 2). Аппрессории на устьицах имели округлую или овальную форму, но меньшие размеры, чем в контроле (рис. 1, *м, н*). В большинстве случаев развитие *P. triticina* на овсе останавливалось на стадии аппрессория или подустыичной везикулы, и лишь в 2 % случаев образовывалась инфекционная гифа в подустыичной полости (рис. 1, *н*). Проникновение возбудителя корончатой ржавчины в листья пшеницы происходило успешнее, при этом 15 % аппрессориев образовали тонкие инфекционные гифы, часть которых (9 %) сформировала материнские клетки гаусториев и карликовые гаустории в клетках пшеницы. Внедрение гаусториев заканчивалось отмиранием мезофильных клеток в результате реакции сверхчувствительности (рис. 1, *о*).

Клетки ржавчинных грибов дикариотичны. При прорастании споры 2 ядра переходят в ростковую трубку. На примере возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* продемонстрировано, что в процессе образования аппрессория происходит митотическое деление и образуется 4-ядерная клеточная структура (Андреев, Плотникова, 1989). В наших экспериментах в аппрессориях грибов, развивавшихся на восприимчивых растениях-хозяевах, выявлялись 4 ядра, в то время как во многих аппрессориях и подустыичных везикулах на иммунных видах обнаружены только 2 ядра (рис. 1, *м; 3 а*).

Дополнительное изучение клеточных структур грибов было проведено с помощью люминесцентной микроскопии с применением красителя акридинового оранжевого. Лучшая дифференциальная окраска клеток целых листьев растений и ржавчинных грибов была получена при pH 5.6. При этом ДНК в ядрах окрашивалась в желто-зеленый цвет, РНК — в красный, цитоплазма расте-

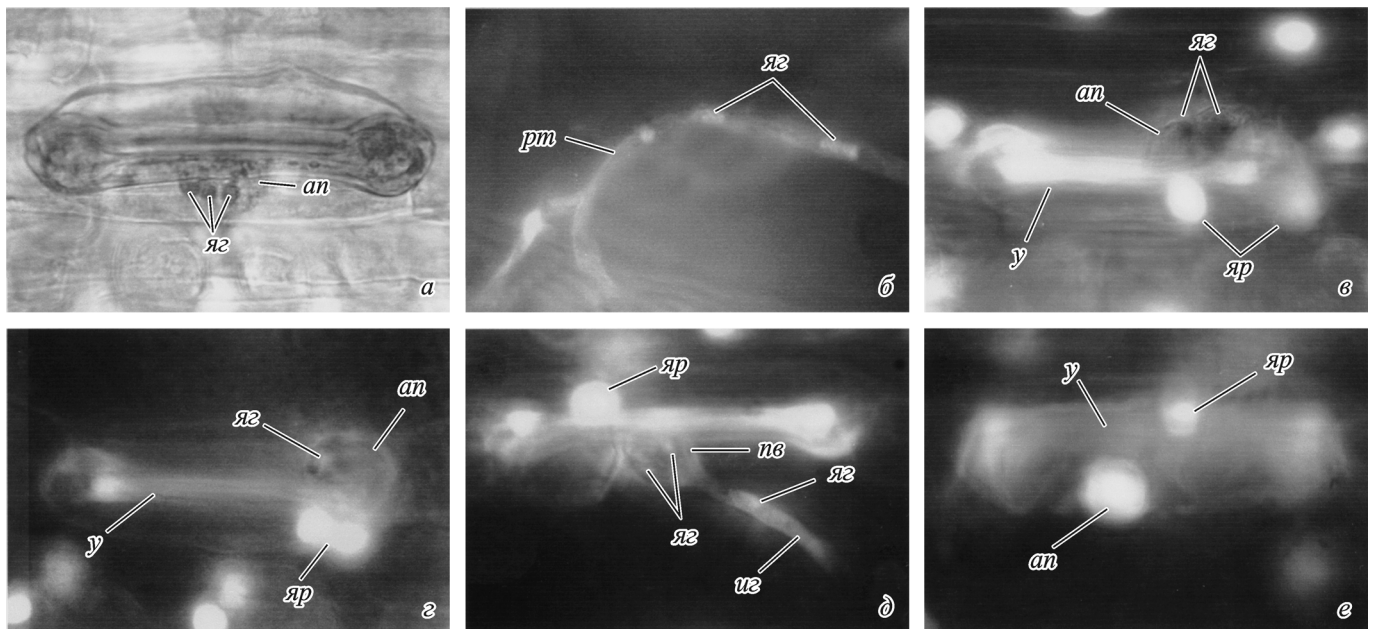


Рис. 3. Особенности клеток и ядерного аппарата ржавчинных грибов при развитии на листьях злаков.

*a* — аппрессорий *P. triticina* на устьице пшеницы; видны 3 из 4 ядер; окраска анилиновым голубым; *б* — ядра гриба в кончике ростковой трубки, окраска акридиновым оранжевым; *в* — аппрессорий *P. coronata* на устьице овса, в ядрах гриба выявляются большие красные ядрышки; *г* — аппрессорий *P. triticina* на устьице овса, ядро гриба желто-зеленое; *д* — подустыичная везикула и инфекционная гифа *P. triticina* в листе овса, ядра желто-зеленые; *е* — некротический аппрессорий *P. coronata* на устьице пшеницы. Увел.: *a* — об. 70×, ок. 15×; *б–е* — об. 20×, ок. 4×. *ап* — аппрессорий, *иг* — инфекционная гифа, *ик* — некротическая клетка растения, *пв* — подустыичная везикула, *пт* — ростковая трубка, *у* — устьице, *яг* — ядро гриба, *яп* — ядро растения.

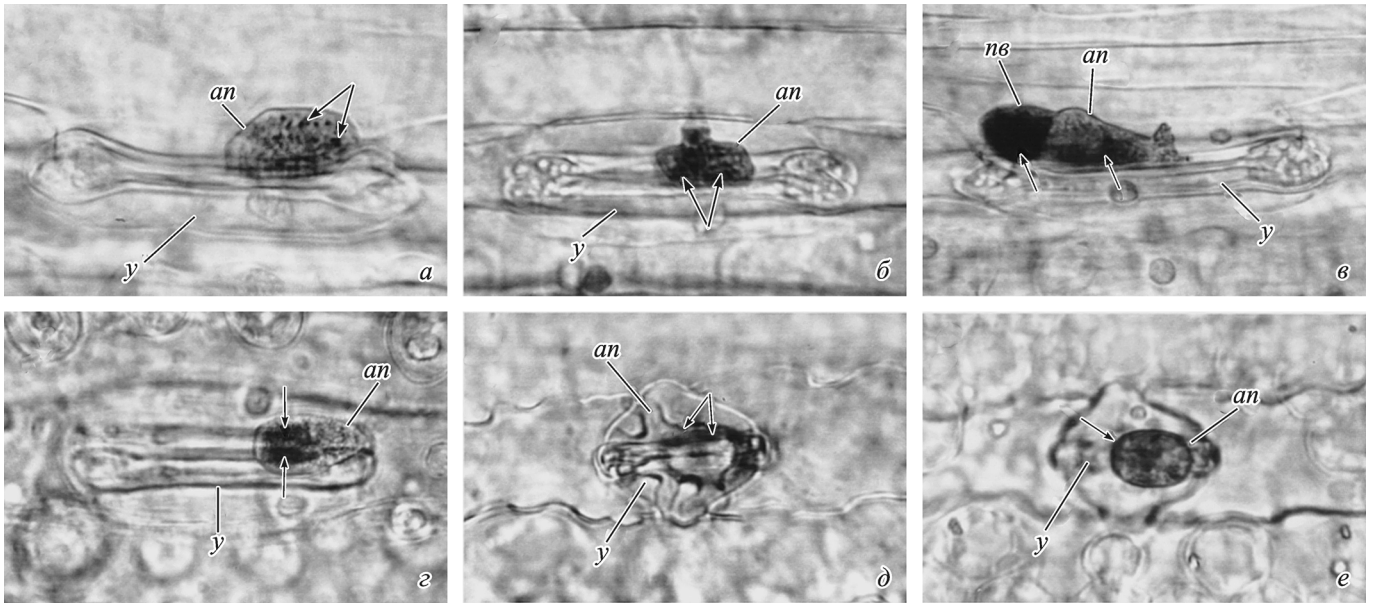


Рис. 4. Образование активных форм кислорода при взаимодействии ржавчинных грибов с иммунными видами злаков. Окраска нитросиним тетразолием (стрелки).

*a* — аппрессорий *Puccinia triticina* на устьице пшеницы, окрашены митохондрии гриба; *б* — диффузная окраска в аппрессории *P. triticina* на устьице овса; *в* — интенсивная диффузная окраска подустьичной везикулы *P. coronata* на устьице пшеницы; *г* — накопление активных форм кислорода в месте контакта аппрессория *P. triticina* с клеточными стенками овса в районе устьичной щели; *д, е* — образование активных форм кислорода в зоне контакта нижней части аппрессория *P. triticina* с замыкающими клетками устьица кукурузы; снимки в разных плоскостях фокуса. Увел.: *a, в—е* — об. 20×, об. 15×; *б* — об. 40×, об. 15×. *an* — аппрессорий, *nb* — подустьичная везикула, *y* — устьице.

ний — в зеленый, цитоплазма грибов имела оттенки красного цвета. В ростковых трубках грибов, развивавшихся на поверхности всех злаков, ядра имели вытянутую форму и были окрашены в зеленый цвет (рис. 3, б). При развитии аппрессориев и подустьичных везикул на восприимчивых растениях в ядрах выявлялись большие красные ядрышки, а цитоплазма клеток грибов была окрашена в красно-оранжевый цвет, что свидетельствует о высоком содержании РНК (рис. 3, в). На растениях-нехозяевах ядра грибов в аппрессориях и подустьичных везикулах имели преимущественно желто-зеленый цвет, а цитоплазма была светло-оранжевой (рис. 3, г, д). Известно, что некротические клетки сильнее связывают акридиновый оранжевый, а люминесценция при увеличении концентрации красителя в клетках сдвигается в красную область спектра (Зеленин, 1967). В наших экспериментах уже через 16 ч после инокуляции значительная доля аппрессориев на устьицах нехозяев имела яркую оранжево-желтую окраску, характерную для некротических клеток (рис. 3, е).

В настоящее время известно, что при узнавании несовместимых патогенов в растениях индуцируются два экспрессных механизма защиты — окислительный взрыв, возникающий при накоплении активных форм кислорода (АФК) и синтез защитных PR-белков (pathogenesis related protein). Роль АФК в видовом иммунитете нами была изучена двумя методами: 1) цитохимическим выявлением супероксид-аниона  $O_2^-$  с применением специфического красителя нитросинего тетразолия; 2) путем изучения развития грибов в растениях, обработанных ингибитором окислительного взрыва верапамилом.

В наших экспериментах критическими этапами во взаимодействии ржавчинных грибов с иммунными злаками были образование аппрессориев и проникновение в подустьичную полость листьев. В связи с этим цитохимическую реакцию на АФК проводили через 12 ч после ино-

куляции, когда на листьях присутствовал набор клеточных структур грибов (споры, ростковые трубки, аппрессории и первые подустьичные везикулы), а также через 16—20 ч, когда проникновение в подустьичную полость закончилось.

Реакция с нитросиним тетразолием проявлялась в форме локального синего окрашивания в местах накопления АФК, при этом остальные участки ткани растений и структуры гриба были бесцветными. В клетках грибов на восприимчивых растениях мягкой пшеницы и овса краситель накапливался только в гранулярных цитоплазматических структурах в кончиках гиф или аппрессориев, что связано, вероятно, с функционированием дегидрогеназ в митохондриях грибов (Heath, 1998) (рис. 4, а). На устьицах иммунных злаков часть аппрессориев, а иногда и подустьичные везикулы имели интенсивную диффузную синюю окраску (рис. 4, б, в). Большое количество окрашенных инфекционных структур было выявлено при развитии *P. triticina* на овсе и *P. coronata* на пшенице (примерно 1/5 часть аппрессориев), реже окраска обнаруживалась при контакте инфекционных структур с устьицами кукурузы. Наиболее интенсивное накопление красителя наблюдалось в месте контакта инфекционных структур со стенками замыкающих клеток устьиц (рис. 4, г). *P. triticina* в некоторых случаях проникал в устьица кукурузы, при этом окраска проявлялась по периметру нижней части аппрессориев, контактирующей со стенками замыкающих клеток устьиц, но интенсивного накопления красителя в клетках гриба не установлено (рис. 4, д, е). Окрашивание образцов через 16 и 24 ч после инокуляции присутствия АФК не выявило.

Окислительный взрыв происходит быстро и не всегда может быть обнаружен цитохимически. Поэтому роль АФК в видовом иммунитете была дополнительно изучена с помощью верапамила. Верапамил блокирует поступление

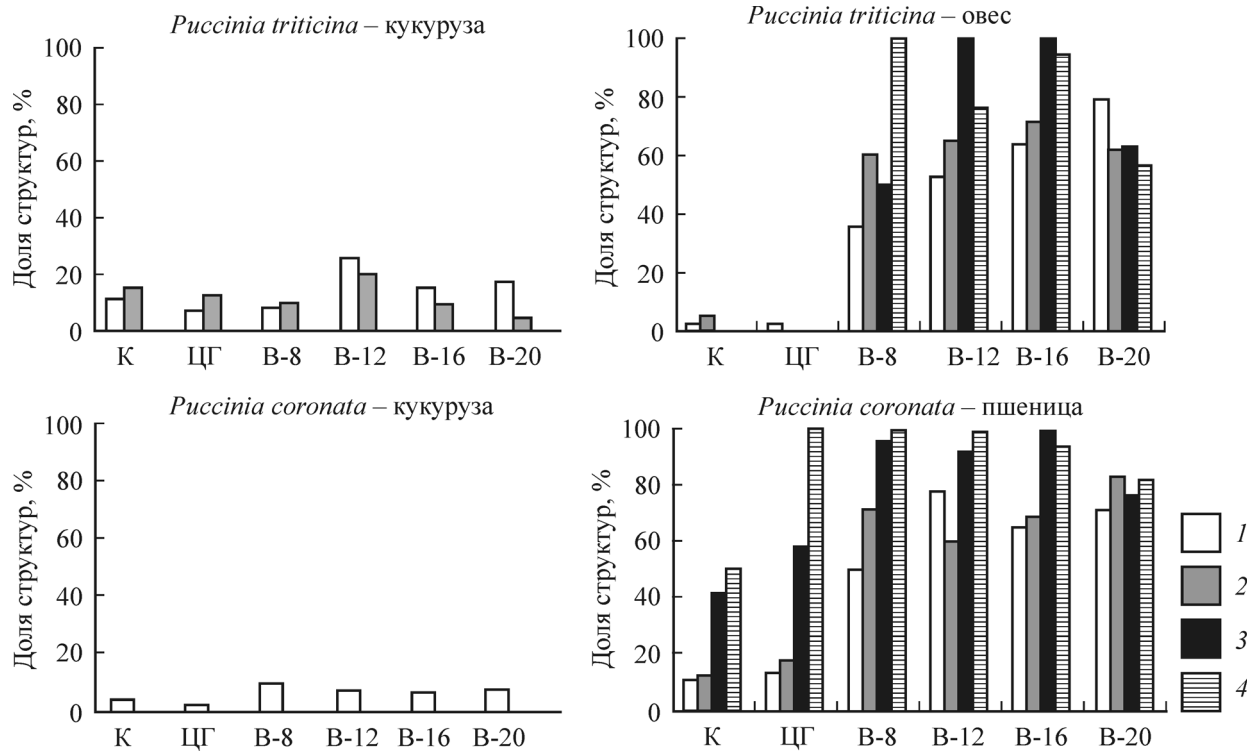


Рис. 5. Влияние ингибиторов окислительного взрыва и синтеза белка на развитие инфекционных структур ржавчинных грибов и проявление реакции сверхчувствительности в листьях иммунных видов злаков.

Доля инфекционных структур, %: 1 — аппрессориев на устьицах, образовавших инфекционные гифы; 2 — инфекционных гиф, образовавших материнские клетки гаусториев; 3 — материнских клеток гаусториев, образовавших гаустории; 4 — доля клеток растений с гаусториями, погибших в результате реакции сверхчувствительности. К — контроль, ЦГ — циклогексими́д, В-8 — верапамил 8 ч, В-12 — верапамил 12 ч, В-16 — верапамил 16 ч, В-20 — верапамил 20 ч.

в клетку ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимых для формирования разности потенциалов на мембранах и действия ферментов, образующих активные окислители (Boller, Keen, 2000).

Обработка растений существенно не отразилась на развитии грибов в листьях видов-хозяев в течение 2 сут, но через 3 сут после инокуляции, наблюдалось замедление роста колоний. Подавление окислительного взрыва приводило к усилению проникновения ржавчинных грибов в подустьичные полости листьев всех видов-нехозяев. Количество инфекционных структур повышалось по мере удлинения срока обработки растений верапамилом. У *P. triticina* на кукурузе образование инфекционных гиф усиливалось в 1.5—2.5 раза, повышалось количество материнских клеток гаусториев, но гаустории в клетках не образовывались и отмирания клеток растения в результате реакции сверхчувствительности не наблюдалось (рис. 5, а). В то же время у *P. coronata* на кукурузе преимущественно увеличивалось количество подустьичных везикул, и лишь часть из них (10—22 %) образовывала короткие инфекционные гифы (рис. 5, в).

Подавление образования АФК приводило к существенному усилению развития *P. triticina* на овсе. Если в контрольных растениях овса возбудитель бурой ржавчины останавливался в развитии преимущественно на стадии аппрессория или подустьичной везикулы, то при длительной обработке растений верапамилом в большинстве инфекционных мест (до 80 %) сформировалось по одной инфекционной гифе и материнской клетке гаусториев. В некоторых случаях в мезофильных клетках образовались карликовые гаустории, что, как правило, приводило к отмиранию клеток в результате реакции сверхчувстви-

тельности (рис. 5, б). Сходные закономерности наблюдались при взаимодействии возбудителя корончатой ржавчины овса *P. coronata* с пшеницей. При подавлении окислительного взрыва резко увеличивалось количество инфекционных гиф, материнских клеток гаусториев и гаусториев, при этом пораженные клетки пшеницы отмирали в результате реакции сверхчувствительности (рис. 5, г). В редких случаях гриб образовывал вторую инфекционную гифу, однако дальнейшего развития мицелия не происходило. Несмотря на подавление окислительного взрыва, гаустории гриба имели малые размеры, а гифы были существенно тоньше, чем в листьях овса. Обработка листьев верапамилом в течение 20 ч приводила к снижению интенсивности образования инфекционных структур и уменьшению количества некротических клеток растения (рис. 5, а—г).

Роль синтеза белков в видовом иммунитете была изучена на примере растений, обработанных ингибиторами биосинтеза белка — циклогексими́дом и актиномицином Д. Подавление синтеза белков у хозяев — пшеницы и овса — не повлияло на развитие грибов в течение первых 2 сут после инокуляции, однако через 3 сут после заражения наблюдалось замедление распространения инфекционных гиф. Обработка листьев растений-нехозяев не привела к достоверному изменению интенсивности проникновения грибов в устьичные щели, не повлияла на развитие *P. triticina* в тканях кукурузы и овса, а также *P. coronata* — в тканях кукурузы. Некоторое усиление образования инфекционными гифами материнских клеток гаусториев, а также повышение количества гаусториев были отмечены при развитии *P. coronata* на пшенице.

При этом гаустории оставались недоразвитыми, их внедрение приводило к отмиранию клеток пшеницы в результате реакции сверхчувствительности (рис. 5, з). На гистограммах приведены результаты опытов с использованием циклогексимида в концентрации 2.5 мг/мл.

### Обсуждение

Существует мнение о том, что для поражения вида паразит должен приобрести специализированные черты метаболизма, обеспечивающие существование на растениях, а также выработать способы преодоления защитных механизмов (Ellingboe, 1976). Установлено, что успешное развитие паразитических грибов стимулируется морфологическими особенностями поверхности растения, степенью ее гидрофобности, а также химическими соединениями. При получении комплекса положительных сигналов индуцируются образование и дифференциация клеток грибов (Moerschbacher, Mendgen, 2000).

Процесс установления паразитических отношений с растениями-хозяевами весьма сложен. В наших экспериментах было продемонстрировано, что при развитии ржавчинных грибов *Puccinia triticina* и *P. coronata* на листьях видов-нехозяев класса Двудольные (семейства Agaceae, Vego-niaceae и Rosaceae) нарушалось прикрепление ростковых трубок к поверхности, а на устьицах проса и кукурузы аппрессории не были способны плотно контактировать с замыкающими клетками. Ранее на примере возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы *P. graminis* f. sp. *tritici* было показано участие ферментов, синтезируемых в апексе ростковой трубки, в ее прикреплении к поверхности (Андреев, Плотнова, 1989). Можно предположить, что наблюдавшееся нами нарушение адгезии клеточных структур грибов к поверхности листьев связано с отсутствием в их геноме информации для синтеза необходимых ферментов.

На листьях растений семейства Liliaceae (класс Однодольные) ростковые трубки надежно прикреплялись к поверхности листьев, однако проходили мимо устьиц, не образуя аппрессориев. Единичные аппрессории формировались только на листьях лука, они имели необычную форму с многочисленными выростами и не обеспечивали проникновения гриба в лист. На поверхности растений иммунных видов семейства Roaceae улучшалось развитие всех поверхностных структур грибов, хотя остановка паразитов происходила на ранних этапах. На листьях филогенетически далеких от мягкой пшеницы и овса видов (проса и кукурузы) нарушались узнавание ростковыми трубками устьиц и формирование аппрессориев. Возбудитель бурой ржавчины пшеницы *P. triticina* останавливался в развитии на стадии аппрессориев или при проникновении в устьица на овсе, на кукурузе в части инфекционных мест образовались инфекционные гифы и в очень редких случаях — материнские клетки гаусториев. *P. coronata* на кукурузе формировал только аппрессории, в то время как на пшенице в 15 % инфекционных мест образовывал тонкие инфекционные гифы, а в некоторых случаях — карликовые гаустории.

Ранее при изучении взаимоотношений возбудителей ржавчинных болезней злаков *P. hordei* и *P. graminis* f. sp. *tritici* с видами-нехозяевами (пшеницей и кукурузой соответственно) также было установлено, что грибы прекращали развитие преимущественно на стадии одной инфекционной гифы, в редких случаях — материнской клетки гаустория (Leath, Rowell, 1966; Niks, 1983). В то же время

специализированные к видам семейства Бобовые формы ржавчинного гриба *Uromyces phaseoli* были способны более успешно развиваться и образовывать гаустории в тканях растений-нехозяев — подсолнечнике, кукурузе и капусте (Heath, 1977).

Вероятно, наблюдавшиеся нами и описанные в литературе различия в формировании инфекционных структур на растениях разных видов в существенной степени связаны с различными способностями грибов воспринимать морфологические и химические особенности листьев в качестве индукторов развития. Дополнительным доводом в пользу стимуляции со стороны растений являются установленные нами с помощью люминесцентной микроскопии высокий уровень РНК в ядрышках и цитоплазме грибов на восприимчивых сортах и низкое ее содержание на иммунных видах. О неполноценном взаимодействии свидетельствует также присутствие в части аппрессориев на иммунных видах растений лишь 2 ядра вместо 4, что, вероятно, связано с нарушением митотического деления ядер. Нарушение деления ядер в инфекционных структурах было также показано при развитии возбудителя ржавчины вигны на иммунных сортах вида-хозяина (Heath et al., 1996). Отсутствие у растений свойств поверхности и метаболитов, стимулирующих развитие патогенных микроорганизмов, весьма эффективно защищает их от болезней.

Помимо влияния поверхностных свойств листьев в наших экспериментах была изучена роль активных физиологических факторов в защите видов-нехозяев. Известно, что в клетках растений может развиваться окислительный взрыв через 5—10 мин после узнавания патогенов (или их элизиторов), при этом активные формы кислорода могут генерироваться как экстраклеточно, так и интраклеточно (Baker, Orlandi, 1995; Jabs, Slusarenko, 2000). Окислительный взрыв был продемонстрирован при инфицировании грибами класса Оомицетов культуру клеток видов-нехозяев (Naton et al., 1996). В то же время при заражении возбудителем ржавчины фасоли *U. vignae* устойчивых и восприимчивых сортов хозяина (вигны) супероксид-анион не выявлен (Heath, 1998).

Нами впервые показано, что на иммунных видах злаков активные окислители накапливались преимущественно в цитоплазме аппрессориев, расположенных на устьицах. Самая высокая их концентрация отмечалась в месте контакта аппрессориев с клеточными стенками замыкающих клеток в зоне устьичной щели, но не в цитоплазме клеток растения, т. е. происходила экстраклеточная генерация активных форм кислорода. Окислительный взрыв выявлен через 12 ч после инокуляции, когда наиболее активно происходило образование аппрессориев и внедрение грибов в подустыичную полость, но практически не обнаруживался позже. Отмирания замыкающих клеток устьиц не наблюдалось, однако аппрессории приобретали типичную для некротических структур окраску.

Роль окислительного взрыва в видовом иммунитете злаков к ржавчинным грибам нами была подтверждена на растениях с подавленным образованием активных форм кислорода. В настоящее время установлено, что ингибиторы кальциевых каналов подавляют как окислительный взрыв, так и сигнальную трансдукцию, запускающую комплекс иммунных механизмов растений (Xu, Heath, 1998; Boller, Keen, 2000). Общим результатом обработки растений было усиление проникновения грибов в подустыичную полость. В комбинациях «*P. triticina*—овес» и «*P. coronata*—пшеница» в большинстве инфекционных

мест образовались инфекционные гифы, материнские клетки гаусториев и по 1 недоразвитому гаусторию в клетках мезофилла. Пораженные клетки растений отмирали в результате реакции сверхчувствительности. Такой результат сравним с взаимодействием ржавчинных грибов с иммунными сортами видов-хозяев.

Другим экспрессным механизмом иммунитета является синтез защитных PR-белков; часть из них синтезируется в заметных количествах уже через 3—6 ч после узнавания патогена (Hedrick et al., 1988). В наших экспериментах подавление белкового синтеза в большинстве вариантов не оказывало существенного влияния на развитие грибов, за исключением комбинации «*P. coronata*—пшеница», где отмечалось некоторое увеличение интенсивности образования гаусториев. В то же время в экспериментах на фасоли показано, что обработка ингибиторами биосинтеза белка приводила к существенному усилению развития мицелия неспециализированного гриба *U. phaseoli* var. *vignae* (Heath, 1979). Вероятно, защитные белки играют роль на более поздних этапах развития паразитов в тканях растений.

Поскольку в растениях с подавленными механизмами иммунитета изменялось количество инфекционных структур, но не происходило существенного скачка в развитии паразитов, можно предположить, что отсутствие индуцирующих факторов остается приоритетным в защите видов от неспециализированных ржавчинных грибов.

Таким образом, при изучении развития ржавчинных грибов *P. triticina* и *P. coronata* на наборе растений-нехозяев выявлен ряд факторов, определяющих иммунитет видов к паразитическим организмам. Важную роль в пассивной защите растений играют отсутствие у грибов способов прикрепления клеточных структур к поверхности и устьицам растений, а также недостаточная стимуляция их развития со стороны растений иммунных видов. Основным активным механизмом, предотвращающим проникновение грибов в ткани растений, является окислительный взрыв.

### Список литературы

- Андреев Л. Н., Плотникова Ю. М. 1989. Ржавчина пшеницы: цитология и физиология. М.: Наука. 304 с.  
 Зеленин А. В. 1967. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот. М.: Наука. 136 с.  
 Baker C. J., Orlandi E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33 : 299—321.

Boller T., Keen N. T. 2000. Perception and transduction of elicitor signals in host-pathogen interactions. In: *Mechanisms of resistance to plant diseases*. A. J. Slusarenko, R. S. S. Frazer, L. S. van Loon (Eds). The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 189—230.

Ellingboe A. H. 1976. Genetics of host-parasite interactions. In: *Encyclopedia of plant physiology*. R. Heitefuss, P. H. Williams (Eds). Heidelberg; New York: Springer. 761—778.

Heath M. C. 1977. A comparative study of non-host interactions with rust fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 10 : 73—88.

Heath M. C. 1979. Partial characterization of the electron-opaque deposits formed in the non-host plant, French bean after cowpea rust infection. *Physiol. Plant Pathol.* 15 : 141—148.

Heath M. C. 1998. Involvement of reactive oxygen species in the response of resistant (hypersensitive) or susceptible cowpeas to cowpea rust fungi. *New Phytol.* 138 : 251—263.

Heath M. C. 2000. Non-host resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 : 315—319.

Heath M. C., Xu H., Eilam T. 1996. Nuclear behavior of cowpea rust fungus during the early stages of basidiospore — or urediniospore-derived growth in resistant or susceptible cowpea cultivars. *Phytopathology.* 86 : 1057—1065.

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.

Ivanov V. B. 1987. Reactive dyes in biology. *Soviet Science Review. Suppl. Ser. Physicochem. Biol.* Harvard Acad. Publ. 7 : 120—127.

Jabs T., Slusarenko A. J. 2000. The hypersensitive response. In: *Mechanisms of resistance to plant diseases*. A. J. Slusarenko, R. S. S. Frazer, L. S. van Loon (Eds). The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 279—324.

Leath K. T., Rowell L. J. 1966. Histological study of resistance of *Zea mays* to *Puccinia graminis*. *Phytopathology.* 56 : 1305—1309.

Moerschbacher B., Mendgen K. 2000. Structural aspects of defense. In: *Mechanisms of resistance to plant diseases*. A. J. Slusarenko, R. S. S. Frazer, L. S. van Loon (Eds). The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 231—278.

Naton B., Hahlbrock K., Schmelzer E. 1996. Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol.* 112 : 433—444.

Niks R. E. 1983. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost genotypes. *Phytopathology.* 73 : 64—66.

Prell H. H., Day P. R. 2000. Plant-fungal pathogen interaction: a classical and molecular view. Berlin etc.: Springer-Verlag. 214 p.

Xu H., Heath M. C. 1998. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell.* 10 : 585—597.

Поступила 25 VI 2007

### INFLUENCE OF THE SURFACE FEATURES AND PHYSIOLOGICAL REACTIONS OF NON-HOST SPECIES ON THE DEVELOPMENT OF CELLULAR STRUCTURES OF RUST FUNGI

L. Ya. Plotnikova

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

Parasitic rust fungi *Puccinia triticina* and *P. coronata* specialized to cereals are not able to form functionally completed cellular structures (germ tubes and appressoria) on the surface of plant species that do not belong to Poaceae. Fungus structures are induced by the surface features of grains leaves (millet, maize, oat, common wheat) to a different extent. Nuclear division and activity of parasites are partially suppressed on the non-host leaves. Fungi intrusions into sub-stomal cavities of the oat and wheat leaves are predominantly prevented by oxidative burst and to the less extent by defense proteins.

Key words: cellular structures, plant immunity, *Puccinia triticina*, *P. coronata*, oxidative burst, PR-proteins.