

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТ НА ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПШЕНИЦЫ, ИНФИЦИРОВАННОЙ БУРОЙ РЖАВЧИНОЙ

© Л. Я. Плотникова,¹ Т. Ю. Штубей

Кафедра селекции, генетики и физиологии растений Омского государственного аграрного университета;
¹ электронный адрес: LPlotnikova@rambler.ru

Влияние салициловой и янтарной кислот на цитофизиологические реакции растений и клеточные структуры гриба изучены на примере мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., инфицированной бурой ржавчиной. Исследования проводили на проростках изогенной линии сорта Тэтчер с геном устойчивости *Lr19*. Салициловая и янтарная кислоты в различной степени ускоряли и усиливали генерацию активных форм кислорода, синтез каллозы и фенилпропаноидов клетками растений, контактирующих с клеточными структурами авирулентного и вирулентного клонов гриба.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Puccinia triticina*, активные формы кислорода, каллоза, салициловая кислота, фенилпропаноиды, янтарная кислота.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, СК — салициловая кислота, МКГ — материнская клетка гаустория, СВЧ — реакция сверхчувствительности, ФАЛ — фенилаланин-аммиак лиаза, ЯК — янтарная кислота.

Салициловая кислота (СК) является биологически активным соединением, участвующим в организации ответа растений на абиотические и биотические стрессы (Молодченкова, 2001). С помощью биохимических методов установлено, что СК стимулирует проявление защитных реакций растений против болезней, вызываемых биотрофными микроорганизмами: генерацию активных форм кислорода (АФК), накопление защитных PR-белков (PR-белки — pathogenesis related proteins), активацию фенилпропаноидного метаболизма, реакцию сверхчувствительности и т. д. (Metraux, 2001). Действие янтарной кислоты (ЯК) исследовано меньше, однако, известно, что ЯК и СК индуцируют синтез сходных по электрофоретической подвижности растворимых белков, а также усиливают окислительный взрыв. На этом основании предполагается, что ЯК является физиологическим миметиком СК в активации защитных реакций от патогенов (Тарчевский и др., 1999). В настоящее время отсутствует информация о влиянии этих биологически активных соединений на клеточные проявления устойчивости к грибным болезням.

В связи с этим было исследовано влияние салициловой и янтарной кислот на цитологические реакции мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и клеточные структуры гриба *Puccinia triticina* Erikss. при развитии бурой ржавчины.

Материал и методика

Объектами исследований были 9-дневные проростки изогенной линии мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Тэтчер с геном устойчивости *Lr19*, инфицированные урединоспорами гриба *Puccinia triticina* Erikss., вызывающего заболевание бурой ржавчиной.

Проростки отдельно опрыскивали 0.01%-ным раствором СК или ЯК в дистиллированной воде из расчета 10 мл на 100 растений (Гютерев, 2002). Контролем служили растения, обработанные водой. Через 2 сут после обработки листья заражали моноспоровым инокулюмом вирулентного и авирулентного клонов гриба. Инфицированные растения выдерживали на светоустановке с лампами дневного света при 18—22 °С в течение 9 сут до появления пустул на контрольных растениях. Тип реакции растений на заражение грибом оценивали по 4-балльной шкале (Mains, Jackson, 1926). При инфицировании вирулентным клоном растения были восприимчивы, на их листьях развивались крупные пустулы гриба (тип реакции 4 балла). При заражении авирулентным клоном растения проявляли устойчивость, на них развивались небольшие пустулы, окруженные зоной клеток, погибших в результате реакции сверхчувствительности (СВЧ) (2 балла).

Генерацию АФК изучали на примере супероксид-аниона $O_2^{\cdot-}$. Его присутствие выявляли через 12, 24 и 36 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 кипячением в лактофенольной смеси (фенол, молочная кислота, глицерин, дистиллированная вода и этиловый спирт в соотношении 1 : 1 : 1 : 1 : 8). В присутствии $O_2^{\cdot-}$ краситель образовывал нерастворимое синее соединение. В каждом варианте изучали 50 инфекционных мест.

Развитие инфекционных структур гриба и проявление защитных реакций растений исследовали на целых листь-

ях, фиксированных в лактофеноле. Фиксацию проводили через 1, 2, 3, 5 и 9 сут после инокуляции. Клеточные структуры грибов на поверхности и в тканях выявляли путем окрашивания листьев 1%-ным красителем анилиновым синим в лактофеноле и последующей дифференциации окраски в насыщенном растворе хлоралгидрата. В результате структуры гриба окрашивались в синий цвет, неповрежденные клетки растений — в светло-голубой, некротические клетки — в темно-синий. Присутствие каллозы определяли окрашиванием материала в 1%-ном растворе кораллина (розовая кислота) в 4%-ном водном растворе соды Na_2CO_3 (Барыкина и др., 2004). Каллоза на клеточных стенках окрашивалась в розово-красный цвет. Фенилпропаноиды окрашивали серноокислым анилином (1 г сульфата анилина, 2 мл уксусной кислоты и 87 мл 50%-ного этилового спирта) в течение 1 ч (Джапаридзе, 1953). Лигнин в проводящих пучках и фенилпропаноиды в зоне колоний окрашивались в желто-коричневый цвет.

Развитие инфекционных структур гриба, проявление реакции сверхчувствительности, цитохимические реакции на O_2^- , каллозу и фенилпропаноиды изучали с помощью светового микроскопа МБИ-15. Микрофотосъемку проводили с помощью фотокамеры марки Olympus SP-320 (разрешение 7 мегапикселей на 1 дюйм).

Автофлуоресценцию фенилпропаноидов исследовали с помощью люминесцентного микроскопа Люмам-5. Для этого после окраски анилиновым синим кусочки листьев промывали калий-фосфатным буфером (pH 6.0) в течение 1 ч и наблюдали в капле глицерина (Rubiales, Niks, 1995). Использовали возбуждающий светофильтр с максимумом эмиссии 365 нм и пропускающий фильтр с диапазоном волн 530—640 нм. Лигнин в проводящих пучках имел яркое зеленое свечение, клеточные стенки здоровых тканей — слабое зеленое. В инфекционных местах автофлуоресценция фенилпропаноидов в цитоплазме и лигнина на клеточных стенках имела оттенки от красного до желто-зеленого цвета. Некротические клетки проявляли желтую автофлуоресценцию. Для микрофотосъемки использовали режимы работы фотокамеры Olympus SP-320, усиливающие восприятие красной области спектра. При этом на снимках цитоплазма некротических клеток имела желто-оранжевый цвет, а фенилпропаноиды в зоне колоний выявлялись отчетливее.

Особенности развития гриба и защитных реакций изучали в 25 инфекционных местах на 5 растениях по каждому варианту. Размеры колоний, некротических зон, а также участков листьев с отложениями каллозы, лигнина и фенилпропаноидами в цитоплазме определяли с помощью окуляр-микрометра. Площадь рассчитывали по формуле площади эллипса. По всем данным вычисляли средние значения для вариантов и ошибку средней.

Использованные реактивы: анилиновый голубой (Sigma, Германия); кораллин (розовая кислота), нитросиний тетразолий, салициловая кислота и хлоралгидрат (Acros, США); серноокислый анилин (Реахим, Россия); янтарная кислота (Serva, США).

Результаты

Развитие гриба начиналось с попадания урединиоспор на листья. Во влажных условиях споры активно прорастали, образовывали ростковые трубки, которые направлялись к устьицам и формировали на них специаль-

ные структуры — аппрессории. Цитоплазма гриба перемещалась из аппрессориев в подустьичные везикулы, оставляя на поверхности лишь пустые оболочки. Различий в развитии вирулентных и авирулентных клонов на поверхности листьев контрольных растений не наблюдали. Подустьичные везикулы формировали инфекционные гифы, материнские клетки гаусториев (МКГ) и гаустории в мезофилльных клетках (рис. 1, а). Гаустории играют важную роль во взаимодействии биотрофного гриба с растением и поглощении питательных веществ из его клеток. Мицелий вирулентного клона активно ветвился, в нем через 3 сут после инокуляции появлялись длинные распределительные гифы, обеспечивавшие быстрое освоение грибом новых участков листа (рис. 1, б). Через 9 сут после инокуляции колонии образовывали пустулы с новой генерацией спор. Цитологические признаки нарушения взаимодействия растений с вирулентным клоном отсутствовали.

Формирование инфекционных структур авирулентного клона (инфекционных гиф, МКГ, гаусториев) в ткани листьев контрольных растений существенно отставало от показателей вирулентного клона уже через 2 сут после инокуляции. Мезофилльные клетки растений после внедрения в них гаусториев авирулентного клона отмирали в результате реакции сверхчувствительности (СВЧ). Первые признаки реакции СВЧ проявлялись в форме коллапса — потери формы клетками, кроме того, в половине инфекционных мест наблюдалось усиление окраски цитоплазмы через 1 сут после инокуляции. По мере разрушения цитоплазмы окраска погибших клеток усиливалась и становилась синей. С ростом колоний зона некроза расширялась, однако мицелий продолжал развиваться, через 5 сут его рост усиливался, а через 9 сут после инокуляции грибок формировал небольшие пустулы, окруженные некротической тканью (рис. 1, в; 2, а).

Предварительная обработка кислотами влияла на визуальные симптомы болезни. При заражении авирулентным клоном растений, обработанных СК, на листьях отмечались мелкие белые некротические пятна, а в варианте с ЯК — более крупные зоны с желто-зеленой окраской. В обоих вариантах грибок не образовывал пустул (тип реакции 0 баллов). При инфицировании обработанных СК или ЯК растений вирулентным клоном наблюдалось сокращение размеров пустул по сравнению с контролем, вокруг них проявлялись зоны хлороза (тип реакции 3 балла).

Цитологические исследования показали, что предварительная обработка растений СК или ЯК приводила к нарушению развития мицелия, более выраженному у авирулентного клона, подавление развития его колоний происходило уже через 2—3 сут после инокуляции. Через 9 сут после инокуляции площадь колоний авирулентного клона гриба в растениях, обработанных ЯК и СК, была соответственно в 1.7—1.8 раза, а вирулентного — в 1.4—1.6 раза меньше, чем в контроле (рис. 2, а—е).

Развитие авирулентного клона гриба в варианте с СК прекращалось в части инфекционных мест (15 %) после внедрения единственного гаустория в клетку растения. В этих случаях отмечались небольшие утолщения клеточных стенок замыкающих клеток устьиц в местах проникновения гриба (рис. 1, е). В остальных инфекционных местах образование инфекционных гиф, МКГ и гаусториев происходило с меньшей интенсивностью, чем в контроле. После обработки растений СК усиливалась интенсивность реакции СВЧ, при этом уже через 1 сут после инокуляции наблюдался коллапс всех клеток с внедрившими-

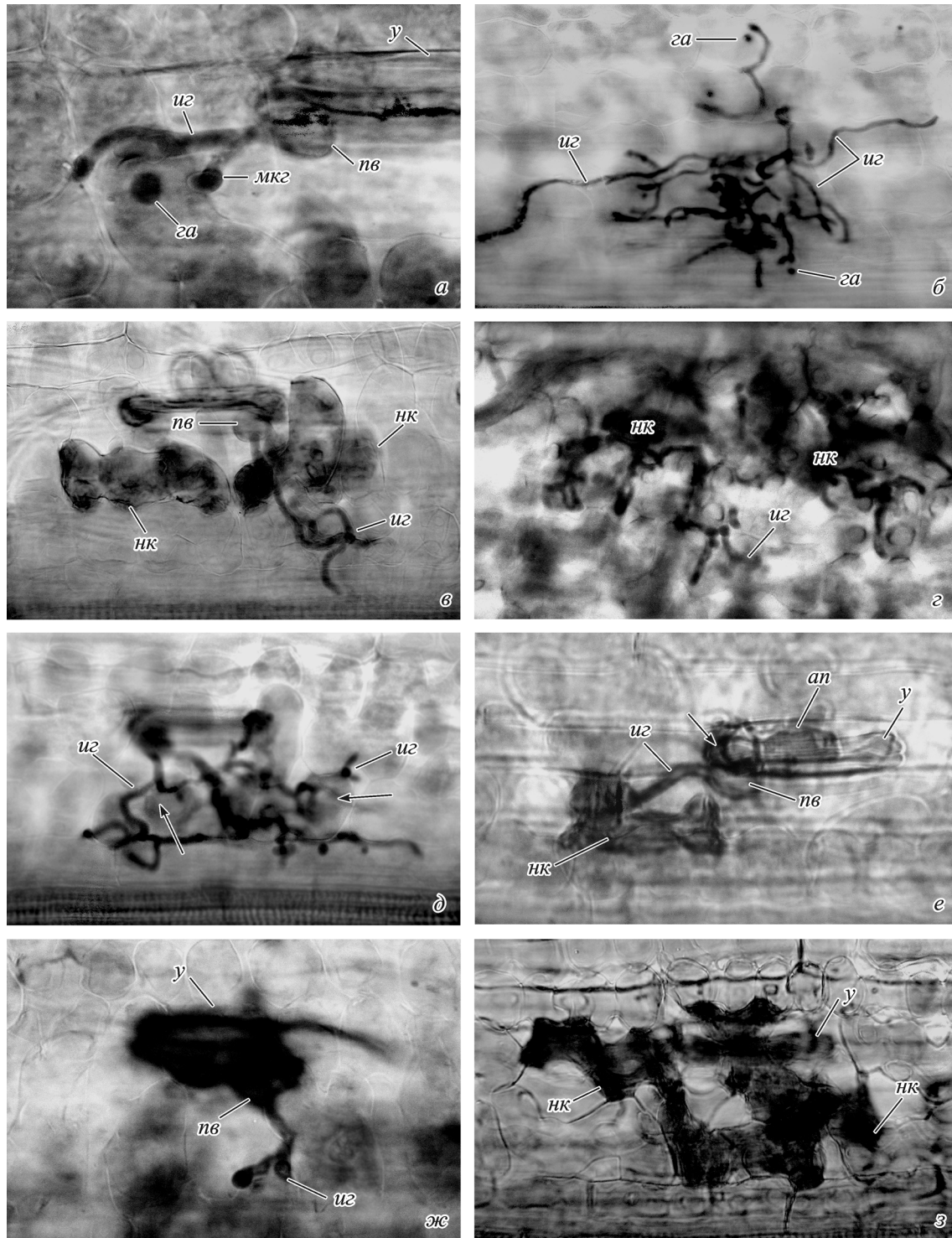


Рис. 1. Влияние салициловой и янтарной кислот на развитие колоний вирулентного (а, б, з, д) и авирулентного (в, е—з) клонов *Puccinia triticea* в листьях пшеницы.

а — подустычная везикула, инфекционные гифы, материнская клетка гаустория и гаусторий в мезофильной клетке контрольного растения (1 сут после инокуляции). б — колония в листе контрольного растения (2 сут после инокуляции). в — мицелий авирулентного клона и проявление реакции СВЧ в листе контрольного растения (2 сут после инокуляции). з — вакуолизованный мицелий вирулентного клона и проявление реакции сверхчувствительности в растении, обработанном СК (5 сут после инокуляции). д — колония вирулентного клона в растении, обработанном ЯК; в зоне колонии клетки с усиленной окраской (стрелки) (3 сут после инокуляции). е — прекращение развития авирулентного клона гриба после внедрения одного гаустория в клетку растения, обработанного СК; клеточные стенки замыкающих клеток устьиц в месте внедрения гриба утолщены (стрелка) (2 сут после инокуляции). ж — прекращение развития гриба на стадии инфекционных гиф в растении, обработанном ЯК (2 сут после инокуляции). з — интенсивная реакция СВЧ при развитии авирулентного клона в растении, обработанном СК (2 сут после инокуляции). an — аппрессорий, ga — гаусторий, u2 — инфекционная гифа, mk2 — материнская клетка гаустория, nk — некротическая клетка, gv — подустычная везикула, y — устьице. Об. 40×, ок. 15×.

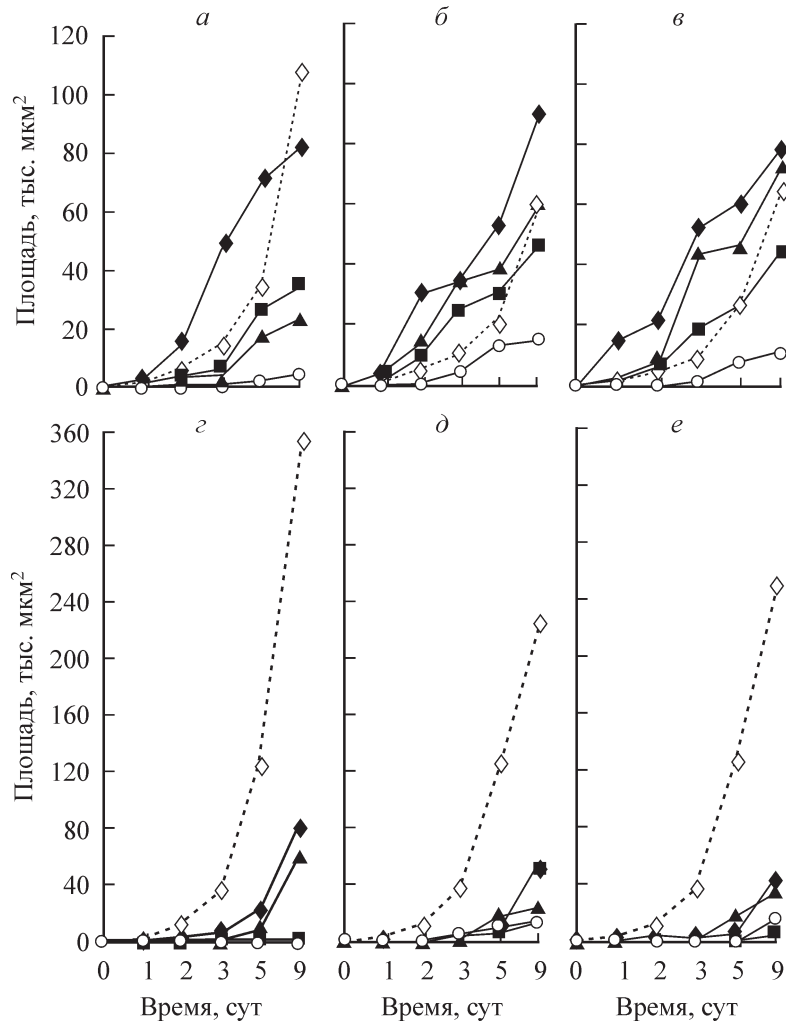


Рис. 2. Динамика развития мицелия и защитных реакций при развитии авирулентного (*a–в*) и вирулентного (*г–е*) клонов в контрольных растениях (*a, г*) и в растениях, обработанных СК (*б, д*) или ЯК (*в, е*).

М — мицелий, СВЧ — реакция СВЧ, РФ — растворимые фенолпропаноиды.

ся гаусториями, их цитоплазма интенсивно окрашивалась анилиновым синим. В дальнейшем отмирали не только клетки с внедрившимися гаусториями, но и соседние (рис. 1, *з*). Через 3–5 сут после инокуляции клеточные стенки некротических и соседних мезофильных клеток были утолщены. Лишь часть колоний (23 %) сформировала спорогенную ткань, но споры не прорывали эпидермис.

На растениях, обработанных ЯК, авирулентный гриб в части инфекционных мест (18 %) остановился до внедрения в мезофильные клетки (на стадиях аппрессория, подустыичной везикулы или одной инфекционной гифы). В таких случаях отмечены мощные утолщения клеточных стенок замыкающих клеток устьиц, а также усиление окраски их цитоплазмы (рис. 1, *ж*). В остальных колониях образование гаусториев было подавлено, а клетки гиф вакуолизированы. Существенного расширения зоны некроза по сравнению с контрольным вариантом не наблюдали (рис. 2, *в*). Хотя при внедрении гаусториев происходил быстрый коллапс мезофильных клеток, их цитоплазма умеренно окрашивалась анилиновым синим. Характерной чертой взаимодействия в данном варианте было утолщение клеточных стенок не только некротических, но и соседних с ними мезофильных клеток,

которое резко усиливалось через 3–9 сут после инокуляции.

Рост колоний вирулентного клона в растениях, обработанных кислотами, замедлялся в течение 3–5 сут после инокуляции, при этом подавлялось образование всех структур гриба. После обработки СК наиболее характерным было ингибирование развития инфекционных гиф, а в варианте с ЯК — МКГ и гаусториев, на поздних стадиях инфекционные гифы были вакуолизированы. На обработанных СК или ЯК растениях сокращалась площадь пустул гриба, в части из них (23 и 18 % соответственно) споры не прорывали эпидермис и не выходили на поверхность. После обработки СК в зоне колоний на поздних этапах эксперимента наблюдались единичные клетки, погибшие в результате СВЧ (рис. 1, *з*). В варианте с ЯК в центре колоний наблюдали сначала 1, затем 3–4 клетки, слабо окрашивающиеся анилиновым синим, но не отмечали коллапса. Через 3–5 сут после инокуляции в обоих вариантах в центре колоний происходило слабое утолщение клеточных стенок растений.

Для выявления защитных реакций растений, дополняющих реакцию СВЧ, были изучены генерация АФК (на примере супероксид-аниона $O_2^{\cdot-}$), синтез защитного полисахарида каллозы (β -1,3-глюкан) и накопление фе-

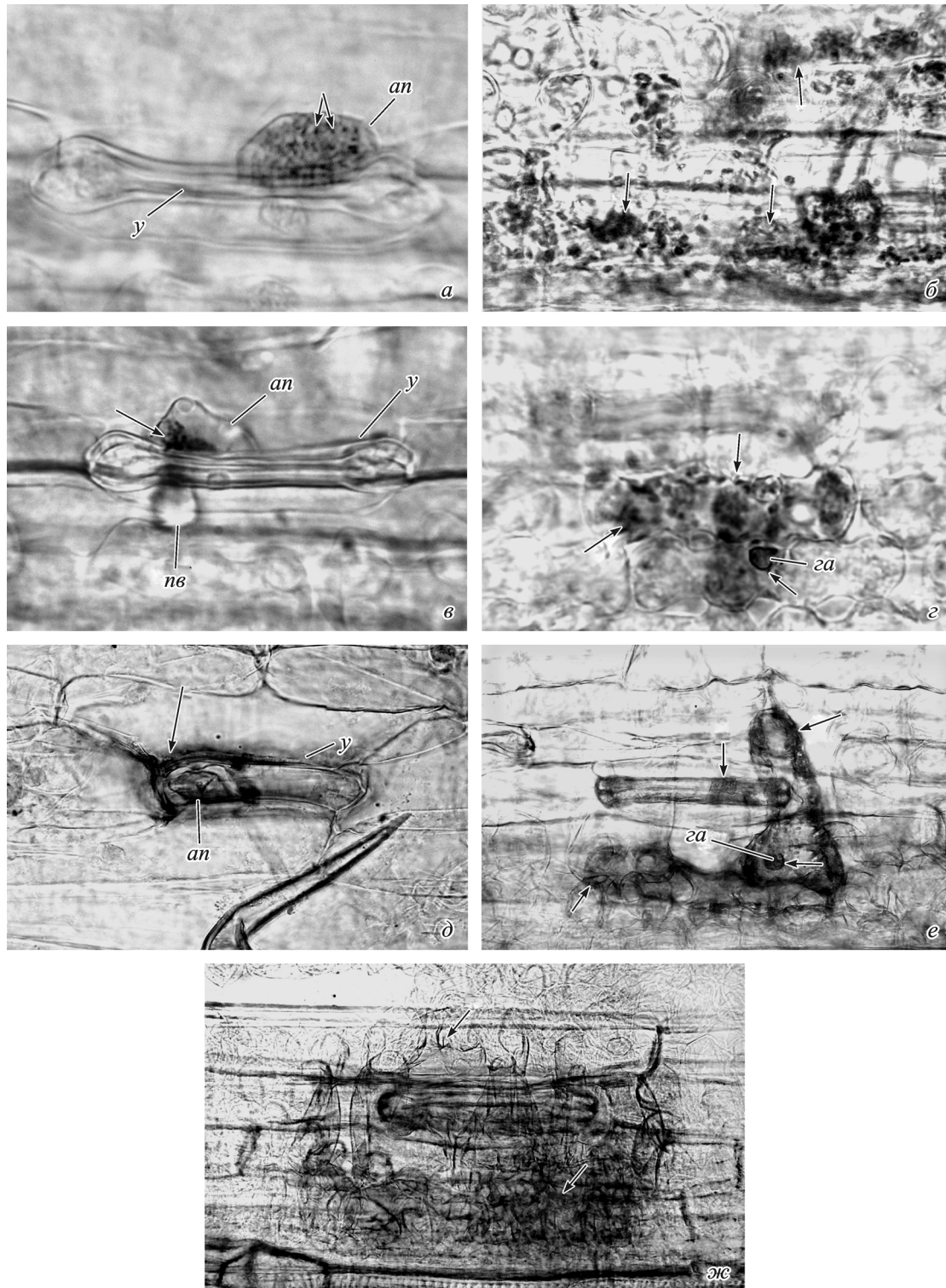


Рис. 3. Накопление супероксид-аниона (б—г) и каллозы (д—ж) в растениях, обработанных ЯК (в, д, ж) или СК (г, е).

Накопление веществ показано стрелками: а — накопление красителя в митохондриях аптессория вирулентного клона гриба, контроль (12 ч после инокуляции); б — в коллапсированных клетках растения при заражении авирулентным клоном, контроль (36 ч после инокуляции); в — в цитоплазме аптессория на устьице растения, обработанного ЯК (12 ч после инокуляции); г — вокруг гаустория и в цитоплазме клеток растения, обработанного СК (1 сут после инокуляции); д — интенсивные отложения каллозы на клеточных стенках замыкающих клеток устьиц, контактирующих с некротическим аптессорием (1 сут после инокуляции); е — отложения каллозы на клеточных стенках и вокруг гаустория в некротических клетках растения, обработанного СК (2 сут после инокуляции); ж — отложения каллозы на клеточных стенках в зоне колонии авирулентного клона в растении, обработанном ЯК (5 сут после инокуляции). Обозначения те же, что и на рис. 1. Увел.: а, в—д — об. 40×, ок. 15 ×; б, е, ж — об. 16×, ок. 15 ×.

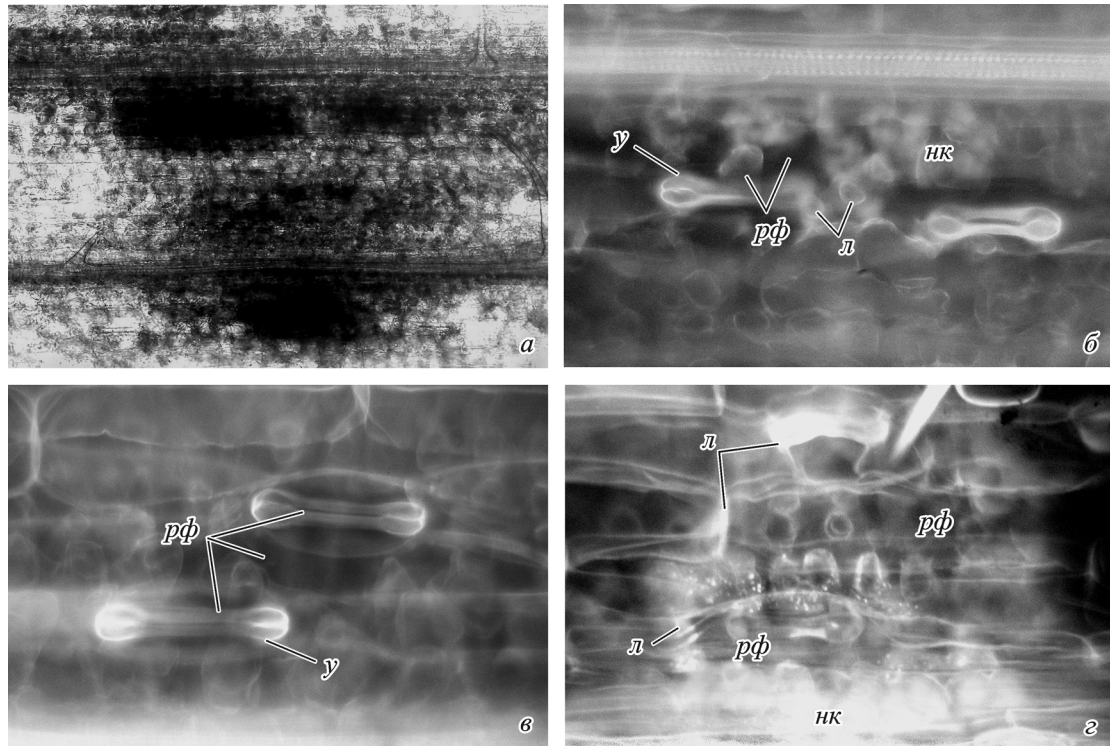


Рис. 4. Накопление фенолпропаноидов в клетках растений в зоне колоний *Puccinia triticina*.

a — окраска серноокислым анилином; *б–г* — автофлуоресценция: *a* — фенолпропаноиды в проводящих пучках, цитоплазме и на клеточных стенках растения в зонах колоний авирулентного клона, контроль (9 сут после инокуляции); *б* — растворимые фенолпропаноиды и отложения лигнина в зоне колонии авирулентного клона, контроль (3 сут после инокуляции); *в* — растворимые фенолпропаноиды в устьицах растения, обработанного ЯК при заражении авирулентным клоном (1 сут после инокуляции); *г* — фенолпропаноиды в зоне колонии авирулентного клона в растении, обработанном СК (5 сут после инокуляции). *л* — лигнин, *рф* — растворимые фенолпропаноиды; остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и 3. Увел.: *a* — об. 10×, ок. 7×; *б, в* — об. 70×, ок. 5×; *г* — об. 40×, ок. 5×.

нилпропаноидов. При заражении вирулентным клоном не выявлено окрашивания нитросиним тетразолием клеток растений, свидетельствующего о накоплении $O_2^{\bullet-}$, ни в контроле, ни в вариантах с СК или ЯК. Краситель накапливался только в гранулярных цитоплазматических структурах аппрессориев, соответствующих по размерам митохондриям гриба, они перемещались вместе с цитоплазмой в подустыичные везикулы при проникновении гриба в устьице (рис. 3, *a*). Эта реакция, вероятно, связана с дегидрогеназной активностью митохондрий паразита.

При заражении авирулентным клоном накопление супероксид-аниона в контрольных растениях выявлено в цитоплазме коллапсированных мезофилльных клеток через 36 ч после инокуляции. $O_2^{\bullet-}$ накапливался вдоль плазматической мембраны, концентрировался в отдельных участках цитоплазмы, а также в структурах, соответствующих по размеру митохондриям и хлоропластам (рис. 3, *б*). В растениях, обработанных ЯК, через 12 ч после инокуляции выявлена генерация $O_2^{\bullet-}$ в месте контакта аппрессориев и подустыичных везикул с клеточными стенками замыкающих клеток устьиц (рис. 3, *в*). При этом супероксид-анион накапливался в цитоплазме клеток гриба, но не замыкающих клеток устьиц. В варианте с СК замыкающие клетки устьиц генерировали $O_2^{\bullet-}$ в небольшом количестве, однако он накапливался вокруг молодых гаусториев и в соседних участках цитоплазмы мезофилльных клеток перед их коллапсом (рис. 3, *г*). Через 36 ч после инокуляции $O_2^{\bullet-}$ выявлен в цитоплазме коллапсированных мезофилльных клеток, причем в варианте с СК

наблюдали более интенсивное его накопление, чем в контрольных растениях.

Изучение накопления защитного полисахарида каллозы показало, что при заражении авирулентным клоном в контрольных растениях слабое или умеренное розовое окрашивание клеточных стенок коллапсированных мезофилльных клеток проявлялось через 1–2 сут после инокуляции. По мере расширения зоны некроза каллоза откладывалась на клеточных стенках мертвых клеток в центре колоний, интенсивность окрашивания усиливалась, что свидетельствует об утолщении отложений. Умеренные отложения каллозы наблюдали на клеточных стенках растений под пустулами. Обработка растений кислотами приводила к усилению накопления каллозы в зоне колоний авирулентного клона, причем ЯК стимулировала более ранний и интенсивный синтез полисахарида, чем СК. В варианте с ЯК отложения каллозы на клеточных стенках замыкающих клеток устьиц рядом с аппрессориями появлялись уже через 1 сут после инокуляции и позже усиливались. Наиболее мощные отложения выявлены на замыкающих клетках устьиц при остановке гриба до внедрения в клетки растения (на стадиях аппрессория, подустыичной везикулы и одной инфекционной гифы) (рис. 3, *д*). Реакцию на каллозу проявляли также коллапсированные клетки с внедрившимися гаусториями. В растениях, обработанных ЯК, резкое расширение зоны синтеза каллозы наблюдалось через 3–10 сут после инокуляции. При этом ярко окрашивались клеточные стенки некротических клеток в зоне мицелия, а также здоровых клеток вне колоний (рис. 2, *в*; 3, *ж*). На поздних этапах

интенсивная реакция на каллозу сохранялась только в некротических клетках, а в остальных клетках снижалась. В обработанных СК растениях небольшие каллозные отложения на клеточных стенках замыкающих клеток устьиц в месте контакта с аппрессориями авирулентного клона выявлялись через 2 сут после инокуляции, в то время как в мезофилльных клетках, погибших в результате СВЧ, интенсивная реакция на каллозу отмечена уже через 1 сут после инокуляции. В некротических клетках каллоза также откладывалась вокруг гаусториев в виде чехлов (рис. 3, *е*). Отложения распространялись по мере увеличения зоны некроза, но были приурочены преимущественно к отмирающим клеткам и слабо распространялись на соседние. К моменту спороношения интенсивность реакции на каллозу снижалась, хотя зона отложений постепенно увеличивалась (рис. 2, *б*).

Развитие вирулентного клона гриба не индуцировало синтез каллозы в тканях контрольных растений. После обработки растений СК или ЯК слабая реакция на каллозу наблюдалась в 1—2 клетках в центре колонии через 2—3 сут после инокуляции. К моменту спороношения слабые каллозные отложения наблюдали на клеточных стенках мезофилльных клеток, расположенных в районах пустул. Синтез каллозы был интенсивнее в растениях, обработанных ЯК (рис. 2, *д, е*).

Присутствие фенилпропаноидов в клетках растений выявляли с помощью гистохимического метода и по их автофлуоресценции. Серноокислый анилин окрашивал лигнин в проводящих пучках в желто-коричневый цвет. В инфекционных местах аналогичную окраску имели фенилпропаноиды, в цитоплазме — растворимые фенилпропаноиды (Beardmore et al., 1983) и лигнин в составе клеточных стенок. При заражении вирулентным клоном контрольных и обработанных кислотами растений окраска серноокислым анилином выявила слабое накопление растворимых фенилпропаноидов в цитоплазме клеток, расположенных в центре колоний и в зоне пустул. При заражении растений авирулентным клоном во всех вариантах через 2 сут после инокуляции окрашивалась цитоплазма некротических клеток, а через 5 сут усиливалась окраска клеточных стенок в центре колоний, что свидетельствовало об отложениях на них лигнина. К моменту спороношения зона накопления фенилпропаноидов расширялась (рис. 4, *а*).

Автофлуоресценция фенилпропаноидов совпадала с зонами накопления веществ, выявленными с помощью окраски серноокислыми анилином, однако люминесцентная микроскопия позволила обнаружить накопление малых количества фенольных производных и продемонстрировала более четкую картину их распределения. При выбранных режимах работы лигнин в проводящих пучках листьев проявлял зеленую автофлуоресценцию, а фенилпропаноиды в инфекционных местах имели оттенки от зеленого до красного цвета. Различная окраска (метахроматический эффект) обусловлена накоплением разных групп производных (McCully, 1966). Анализ динамики накопления растворимых фенилпропаноидов и лигнификации клеточных стенок в зоне колоний был сделан на основе изучения их автофлуоресценции.

При заражении контрольных растений авирулентным клоном светло-красная автофлуоресценция фенилпропаноидов выявлена в апопласте в районе подустыичной полости, а также в цитоплазме коллапсированных и 2—3 соседних клеток через 2 сут после инокуляции. На более поздних этапах цитоплазма некротических клеток приоб-

ретала интенсивное желто-оранжевое свечение (рис. 4, *б*). Через 3—5 сут автофлуоресценция веществ в цитоплазме и апопласте усиливалась и распространялась на большую зону. Зона накопления растворимых фенилпропаноидов была существенно больше площади мицелия и некротической ткани в течение первых 5 сут после инокуляции; лишь к моменту спороношения мицелий выходил из нее (рис. 2, *а*). К моменту образования пустул интенсивная автофлуоресценция растворимых фенилпропаноидов сохранялась только в зоне пустул, на периферии колонии она снижалась. Отложения лигнина с желтой автофлуоресценцией появлялись в малом количестве на клеточных стенках некротических мезофилльных клеток в центре колоний через 5 сут после инокуляции.

При заражении авирулентным клоном растений, обработанных ЯК, автофлуоресценция фенольных производных в цитоплазме замыкающих клеток устьиц и мезофилльных клеток наблюдалась уже через 1 сут после инокуляции, т. е. на 1 сут раньше, чем в контроле (рис. 4, *в*). Позднее зона их накопления расширялась (рис. 2, *в*), через 5—9 сут после инокуляции интенсивная красная автофлуоресценция установлена в клетках и апопласте растения не только в зоне колоний, но и в окружающей ткани. Через 3—5 сут после инокуляции некротические клетки имели оранжево-желтое свечение, на их клеточных стенках появлялись небольшие лигниновые отложения желтого цвета. В варианте с СК через 1 сут после инокуляции наблюдалось слабое светло-оранжевое свечение участков цитоплазмы замыкающих клеток устьиц, но была отчетливо выражена автофлуоресценция мезофилльных клеток, отмерших в результате реакции СВЧ. Существенное расширение зоны автофлуоресценции происходило через 2 сут, ее площадь вдвое превосходила размеры мицелия и некротической зоны (рис. 2, *б*). В течение первых 3 сут свечение было светло-оранжевым, а через 5 сут свечение стало интенсивно красным, что свидетельствовало о повышении содержания фенилпропаноидов (рис. 4, *д*). Активное расширение зоны автофлуоресценции фенилпропаноидов происходило через 9 сут после инокуляции, одновременно слабая автофлуоресценция наблюдалась во всех тканях листа. Отложения лигнина появлялись раньше, чем в контрольных растениях и в варианте с ЯК (через 3 сут после инокуляции), и в большем количестве некротических мезофилльных клеток. К моменту спороношения интенсивность автофлуоресценции фенилпропаноидов в растениях, обработанных СК, была выше, чем в варианте с ЯК и в контроле.

При инфицировании вирулентным клоном контрольных растений слабая автофлуоресценция растворимых фенилпропаноидов выявлялась в центре колоний через 5 сут после инокуляции, а к моменту спороношения фенольные вещества накапливались в умеренном количестве в цитоплазме клеток растения, расположенных под пустулой (рис. 2, *з*). В растениях, обработанных СК, слабая светло-оранжевая автофлуоресценция растворимых фенолов проявлялась в цитоплазме замыкающих клеток устьиц через 2 сут после инокуляции, позже такое же свечение проявлялось в 2—3 мезофилльных клетках, расположенных в центре колонии. Зона автофлуоресценции растворимых фенилпропаноидов увеличивалась к моменту спороношения, под пустулой ее интенсивность усиливалась (рис. 2, *д*). Через 3—5 сут в центре колоний появлялись тонкие лигниновые отложения с зеленой автофлуоресценцией, характерной для лигнина в проводящих пучках. В растениях, обработанных ЯК, автофлуоресцен-

ция растворимых фенилпропаноидов и лигнина проявлялась позже и была менее выражена, чем в варианте с СК (рис. 2, е).

Обсуждение

Синтезируемая растением (эндогенная) СК играет важную роль в индукции комплекса защитных реакций, которые приводят к подавлению развития биотрофных патогенов (Mettraux, 2001). Считается, что индуцирующий эффект экзогенной СК связан с ее способностью проникать в клетки и ингибировать каталазу, разрушающую перекись водорода (H_2O_2) (Leon et al., 1995). H_2O_2 играет роль посредника и запускает НАДФН-оксидазную сигнальную систему, в результате чего активируется набор защитных реакций, включая синтез защитных PR-белков и фенилаланин-аммиак лиаза (ФАЛ) (Тарчевский, 2000). Активация ФАЛ — ключевого фермента фенилпропаноидного метаболизма — приводит к накоплению фенольных кислот, включая СК. Установлено, что ЯК интенсивно ингибирует действие каталазы в растениях гороха, поэтому предполагалось, что ЯК оказывает сходное с СК влияние на защитные реакции растений (Тарчевский и др., 1999).

Проведенные нами исследования продемонстрировали положительный эффект СК и ЯК в повышении устойчивости пшеницы к бурой ржавчине. При визуальных наблюдениях их влияние на симптомы болезни были схожи, однако цитологические исследования выявили особенности воздействия, касающиеся динамики и интенсивности отдельных защитных реакций растений и действия на инфекционные структуры гриба. СК и ЯК имели различный эффект на течение болезни, вызываемой вирулентным и авирулентным клоном *P. triticina*. Обработка кислотами усиливала образование АФК при заражении растений авирулентным клоном гриба. Особенностью действия ЯК была индукция интенсивной экстраклеточной генерации O_2^- замыкающими клетками устьиц при контакте с аппрессориями и подустьичными везикулами. Вероятно, отмирание гриба в значительной части инфекционных мест связано с токсическим действием этого соединения. СК в меньшей степени индуцировала генерацию супероксид-аниона замыкающими клетками устьиц, однако установлены интенсивное накопление O_2^- при внедрении гаусториев в мезофилльные клетки листа и более высокое его содержание по сравнению с контролем в коллапсированных клетках. Установленная стимуляция экстраклеточной генерации АФК замыкающими клетками устьиц является новым фактом, поскольку раньше индуцирующий эффект СК и ЯК связывали с ингибированием каталазы, локализованной в цитоплазме клеток (Тарчевский и др., 1999; Тютереv, 2002).

В наших экспериментах наблюдали различия во влиянии СК и ЯК на реакцию СВЧ. СК значительно усиливала интенсивность реакции СВЧ, что проявлялось в скорости коллапса мезофилльных клеток и интенсивности разрушения их цитоплазмы. В то же время при действии ЯК интенсивность реакции СВЧ была близка к контролю. Известно, что H_2O_2 и СК принимают участие в реализации реакции СВЧ (McDowell, Dangel, 2000), поэтому усиление реакции СВЧ при действии СК вполне объяснимо. Однако отсутствие существенного эффекта ЯК на реакцию СВЧ ставит вопрос об особенностях ее влияния на защитные реакции в нашей модели. Можно предположить несколько вариантов объяснения этого факта: 1) ЯК стиму-

лирует меньшую генерацию АФК в мезофилльных клетках, 2) слабее подавляет внутриклеточную каталазу, 3) сильнее активирует антиоксидантные системы.

Накопление полисахарида каллозы на клеточных стенках является частью ответа растений на биотический стресс. Предполагается двойная роль каллозы в защите растений: восстановление целостности поврежденной клеточной стенки, а также создание барьера, препятствующего поглощению веществ из клеток хозяина (Heath et al., 1996). При развитии возбудителя ржавчины вигны *Uromyces vignae* в иммунном сорте Квин Энн реакция СВЧ не проявлялась, но недоразвитые гаустории были заключены в каллозную оболочку, поэтому авторы считают синтез каллозы основным механизмом устойчивости (Heath et al., 1996).

В наших экспериментах обработки растений СК и ЯК усиливала синтез каллозы при заражении авирулентным клоном гриба. На первых этапах взаимодействия гриба с растениями наблюдались мощные отложения на клеточных стенках замыкающих клеток устьиц, а также на клеточных стенках мезофилльных клеток при интенсивной реакции СВЧ. Именно в этих локусах установлена генерация O_2^- , причем окислительный взрыв на устьицах существенно опережал синтез каллозы. Известно, что быстрое накопление каллозы на клеточных стенках связано с тем, что синтез происходит из имеющихся в клетке мономеров, а индуктором является поступление в цитоплазму ионов Ca^{2+} (Ohana et al., 1992). Поток Ca^{2+} необходимы и для генерации АФК (Тютереv, 2002), поэтому объяснимо быстрое накопление каллозы в локусах, где происходил окислительный взрыв. Поскольку эти явления тесно связаны, отложения каллозы, вероятно, можно рассматривать как цитологический маркер для выявления окислительного взрыва в тканях растений.

В растениях, зараженных авирулентным клоном, синтез каллозы усиливался через 3—9 сут после инокуляции, что было особенно выражено в варианте с ЯК. Возможно, активация синтеза полисахарида сопровождала второй пик окислительного взрыва. Это предположение подкрепляется тем, что через 3—5 сут наблюдалось образование лигнина, в котором участвуют H_2O_2 и пероксидазы, связанные с клеточной стенкой (Dixon, Palva, 1995). H_2O_2 и СК обладают сильным антимикробным действием (McDowell, Dangel, 2000). Вероятно, высокой концентрацией этих веществ в апопласте можно объяснить тот факт, что в варианте с ЯК, хотя реакция СВЧ не усиливалась, клетки мицелия были вакуолизированы, а образование МКГ и гаусториев подавлено.

Фенилпропаноиды представлены в растениях широкой группой веществ, различающихся по химическому составу и свойствам, они составляют существенную часть защитного арсенала от биотических и абиотических стрессов (Dixon, Palva, 1995). Ранее основное внимание уделяли автофлуоресценции некротических клеток, связанной с накоплением окисленных фенольных веществ, а также выявлению лигнификации клеточных стенок растений (Rubiales, Niks, 1995).

Наши исследования показали, что обработка растений СК и ЯК ускоряла и усиливала образование растворимых фенилпропаноидов в клетках зараженных растений. При инфицировании авирулентным клоном автофлуоресценция в цитоплазме замыкающих клеток устьиц наблюдалась уже через 1 сут после инокуляции и была особенно выражена в варианте с ЯК. В то же время без предварительной обработки индукторами устойчивости накопи-

ние ФАЛ в растениях пшеницы и других культур наблюдалось через 1 сут после заражения грибами, а фенольные производные синтезировались через 2—3 сут и более после инокуляции (Тютерева, 2002). Возможно, наблюдавшееся нами быстрое накопление фенольных веществ связано с высвобождением СК из гликозил-салицилатных конъюгатов. Такое экспрессное накопление эндогенной СК после резкого повышения концентрации H_2O_2 в инфекционном месте, а затем более медленное ее накопление в результате индукции генов ФАЛ и синтеза *de novo* показано в других патосистемах (Тарчевский, 1999). С этим предположением согласуется и то, что в наших экспериментах ЯК вызывала более активную генерацию АФК на устьицах.

По мере роста колоний авирулентного клона и развития реакции СВЧ автофлуоресценция фенолпропаноидов в цитоплазме клеток и апопласте усиливалась, а зона накопления фенольных производных расширялась. Лигнификация клеточных стенок усиливалась при предварительной обработке растений кислотами, причем СК оказывала больший эффект, чем ЯК. В то же время лигнин откладывался уже после проявления других защитных реакций и существенного торможения развития колоний гриба. Кроме того, ни в одном из вариантов не образовывалось достаточно мощных отложений, окружающих колонии и препятствующих их росту. Можно предположить, что в нашей модели развитие колоний сдерживали не отложения лигнина, а токсическое действие его предшественников. Такой эффект показан на примере подавления прорастания конидий паразитов огурца *Colletotrichum lagenarium* и *C. cucumerinum* кониферилловым спиртом (Hammershmidt, Kuc, 1982).

При заражении вирулентным клоном контрольных растений умеренная реакция на каллозу и автофлуоресценция фенолпропаноидов выявлялись в клетках растений на поздних этапах патогенеза, преимущественно под пустулами и в прилегающих слоях клеток. Обработка СК и ЯК приводила к слабому усилению цитологических реакций растений. Через 2—3 сут после инокуляции в центре колоний появлялись единичные клетки со слабой реакцией на каллозу, содержащие небольшое количество растворимых фенолпропаноидов, а в варианте с СК на поздних этапах патогенеза появлялись отдельные коллапсированные клетки. Очевидно, эти признаки свидетельствуют об узнавании присутствия гриба и индукции защитных механизмов, поскольку наблюдалась супрессия формирования инфекционных структур и роста колоний гриба. Вероятно, в данном случае устойчивость растений обеспечивалась реакциями, не выявленными с помощью набора использованных методов, например синтезом PR-белков.

Таким образом, полученные нами данные показали, что СК и ЯК оказывают существенный эффект на развитие болезни, вызываемой биотрофным грибом. Кислоты имели особенности влияния на экспрессию защитных реакций растений при заражении авирулентным клоном гриба: СК в большей степени усиливала реакцию

сверхчувствительности, синтез фенолпропаноидов и лигнификацию клеточных стенок растений, а ЯК — образование АФК и синтез защитного полисахарида каллозы. В восприимчивых растениях рост мицелия, вероятно, был ограничен фунгицидным действием защитных PR-белков.

Список литературы

- Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во Москов. ун-та. 312 с.
- Джапаридзе Л. И. 1953. Практикум по микроскопической химии растений. М.: Сов. наука. 178 с.
- Молодченкова О. О. 2001. Предполагаемые функции салициловой кислоты в растениях. Физиол. биохим. культ. раст. 33 (6) : 463—473.
- Тарчевский И. А. 2000. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы. Физиол. раст. 47 (2) : 321—331.
- Тарчевский И. А., Максимова Н. Н., Яковлева В. Г., Гречкин А. Н. 1999. Янтарная кислота — миметик салициловой кислоты. Физиол. раст. 46 (1) : 23—28.
- Тютерева С. Л. 2002. Научные основы индуцированной болезнестойкости растений. СПб.: ООО «Инновационный центр защиты растений», ВИЗР. 328 с.
- Beardmore J., Ride J. P., Granger J. W. 1983. Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Physiol. Plant Pathol.* 22 : 209—220.
- Dixon R. A., Palva N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7 : 1085—1097.
- Hammershmidt R., Kuc J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant Pathol.* 20 : 61—71.
- Heath M. C. 1998. Involvement of reactive oxygen species in the response of resistant (hypersensitive) or susceptible cowpeas to the cowpea rust fungus. *New Phytologist.* 138 : 251—263.
- 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.
- Leon J., Lawton M. A., Raskin I. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108 : 1673—1678.
- Mains E. B., Jackson E. S. 1926. Physiological specialization in the leaf rust wheat *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology.* 16 : 89—120.
- McCully M. E. 1966. Histological studies on genus *Fucus*. *Protoplasma.* LXII (4) : 289—305.
- McDowell J. M., Dangl J. L. 2000. Signal transduction in the plant immunity response. *Trends Biochem. Sci.* 25 : 79—82.
- Mettraux J.-P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur. J. Plant Pathol.* 107 : 13—18.
- Ohana P., Bemiman M., Delmer D. P. 1992. Stimulation of callose synthesis *in vivo* correlates with changes in intracellular distribution of the callose synthase activator P-furfuryl- β -glucoside. *Plant Physiol.* 101 : 187—191.
- Rubiales D., Niks R. E. 1995. Characterization of Lr34, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Disease.* 79 : 1208—1212.

Поступила 27 V 2008

INFLUENCE OF SALICYLIC AND SUCCINIC ACIDS ON THE CYTOPHYSIOLOGICAL REACTIONS
OF WHEAT INFECTED BY BROWN RUST

L. Ya. Plotnikova,¹ T. Yu. Shtubey

Department of Plant Breeding, Genetics and Plant Physiology, Omsk State Agrarian University;

¹ e-mail: LPlotnikova@rambler.ru

The influence of the salicylic and succinic acids on the cytophysiological reactions of the plants and cellular structures of the fungus were investigated using the model of common wheat *Triticum aestivum* L. infected by brown rust. The experiments were performed on seedlings of the isogenic line of var. Thatcher with resistant gene *Lr19*. The salicylic and succinic acids accelerated and enhanced to a different extent the generation of active oxygen species and synthesis of callose and phenylpropanoids by the plant cells contacting with cellular structures of avirulent and virulent fungal clones.

Key words: *Triticum aestivum*, *Puccinia triticina*, active oxygen species, callose, salicylic acid, phenylpropanoids, succinic acid.
