УДК 633.111.1: 632.4: 661.743.1

ЖУК І.В.[1]✉, ДМИТРІЄВ О.П.[1], ЛІСОВА Г.М.[2], КУЧЕРОВА Л.О.[2]
[1] Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: ivzhukvi@gmail.com
[2] Інститут захисту рослин НААН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: mail_gl@ukr.net
✉ *ivzhukvi@gmail.com, (097) 671-86-19*

КОМБІНОВАНА ДІЯ ДОНОРА NO ТА ФЕРУЛОВОЇ КИСЛОТИ ДЛЯ ІНДУКУВАННЯ СТІЙКОСТІ *TRITICUM AESTIVUM* ПРОТИ *SEPTORIA TRITICI*

Мета. Дослідити здатність сигнальної молекули оксиду азоту (NO) підвищувати ефективність дії біотичного еліситора ферулової кислоти у рослин пшениці озимої проти збудника септоріозу листків пшениці гриба *Septoria tritici Rob et Desm.* ***Методи.*** Визначали вміст ендогенного пероксиду водню в листі пшениці сортів Світанок миронівський та Оберіг миронівський, проводили оцінку ступеня ураження, морфометричні виміри та аналіз структури врожаю. ***Результати.*** У польових дослідах показано, що комбінація донора NO та ферулової кислоти знижувала ураження листків на 1–2 бали; у сорту Світанок ендогенний пул пероксиду водню підвищувався на 27 %. ***Висновки.*** Встановлено, що комбінація донора NO та ферулової кислоти NO зменшувала ступінь ураження листкової поверхні збудником септоріозу та стимулювала ріст рослин пшениці. Аналіз біохімічних механізмів показав, що індукування системної стійкості рослин пшениці відбувається за рахунок активації антиоксидантного захисту.
Ключові слова: ферулова кислота, NO, біотичні еліситори, індукована стійкість, *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici Rob et Desm.*

Метод індукування стійкості рослин за допомогою біотичних еліситорів, зазвичай, дає рівень захисту, який не перевищує 20 % [1] Однією з можливостей підвищити ефективність захисних властивостей еліситорів є додавання до еліситорів системних сигнальних молекул. До їх числа належать жасмонова та саліцилова кислота, системін та деякі інші [2]. Вважається, що вміст цих сполук зростає в місцях інфікування несумісним патогеном або обробки еліситором, а потім ці речовини або їх похідні транспортуються флоемою до різних частин рослини (або її органа), де і індукують захисні реакції. Передбачається, що в такій спосіб у рослин відбувається індукування системної стійкості, яка є необхідною властивістю сучасних препаратів захисту рослин.

Раніше нами встановлено, що обробка рослин пшениці комбінованим препаратом, що складався з біотичного еліситора (щавлевої кислоти) та донора NO підвищувала ефективність дії еліситора [3–6]. У нашій роботі ми досліджували здатність сигнальної молекули NO підвищувати ефективність дії біотичного еліситора ферулової кислоти у рослин пшениці озимої проти збудника септоріозу гриба *S. tritici Rob et Desm.*

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сорти пшениці озимої м'якої *Triticum aestivum* L. – Оберіг миронівський, Світанок миронівський. Оригінатор сортів – Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України.

У польовому досліді рослини пшениці обприскували 0,1 мМ водним розчином ферулової кислоти, 0,5 мМ розчином донора оксиду азоту нітропрусиду натрію у фазі виходу в трубку; на третю добу після цього проводили інокуляцію збудником септоріозу листків пшениці *S. tritici Rob et Desm.* у концентрації 10^6 спор/мл із застосуванням прилипача Твін-80.

У якості маркера індукованої стійкості визначали в прапорцевих листках вміст пероксиду водню за реакцією з сульфатом титану [7]. Відбір зразків проводили через добу після зараження і далі протягом періоду колосіння-цвітіння та дозрівання зерна. Для представлення результатів обрано найбільш характерні дані, отримані в період найбільшого прояву розвитку хвороби. Оцінку ураження та ступеня розвитку хвороби проводили у фазу молочно-воскової стиглості зерна, використовуючи 9-бальну шкалу Саарі та Прескотта [8]. У цей же період визначали мор-

© **ЖУК І.В., ДМИТРІЄВ О.П., ЛІСОВА Г.М., КУЧЕРОВА Л.О.**

фометричні параметри – висоту рослин, довжину колоса та прапорцевого листка. Після дозрівання зерна проводили аналіз структури врожаю. Повторність досліду триразова. Результати обробляли статистично з використанням програмного пакета Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Показано, що в інфікованих збудником септоріозу *Septoria tritici Rob et Desm.* листках пшениці озимої за попередньої обробки донором монооксиду азоту вміст ендогенного пероксиду водню у сорту Світанок миронівський зростав на 8 %, у той час як у сорту Оберіг миронівський відбувалося його зменшення на 55 % (рис. 1 А, 2 А). Встановлено, що сорт Світанок миронівський мав знижений на 28 %, а сорт Оберіг миронівський – на 21 % пул ендогенного пероксиду водню за дії ферулової кислоти в інфікованих септоріозом листках рослин пшениці озимої (рис. 1 Б, 2 Б).

Встановлено, що у сорту Світанок миронівський сумісна дія ферулової кислоти та донора монооксиду азоту індукувала зростання на 27 % пулу ендогенного пероксиду водню в інфікованих рослин. Показано, що за поєднання біотичного еліситора ферулової кислоти та донора монооксиду азоту у сорту Оберіг миронівський вміст пероксиду водню в прапорцевих листках, інфікованих збудником септоріозу листків пшениці, на відміну від сорту Світанок миронівський, був зниженим на 55 % (рис. 1 В, 2В).

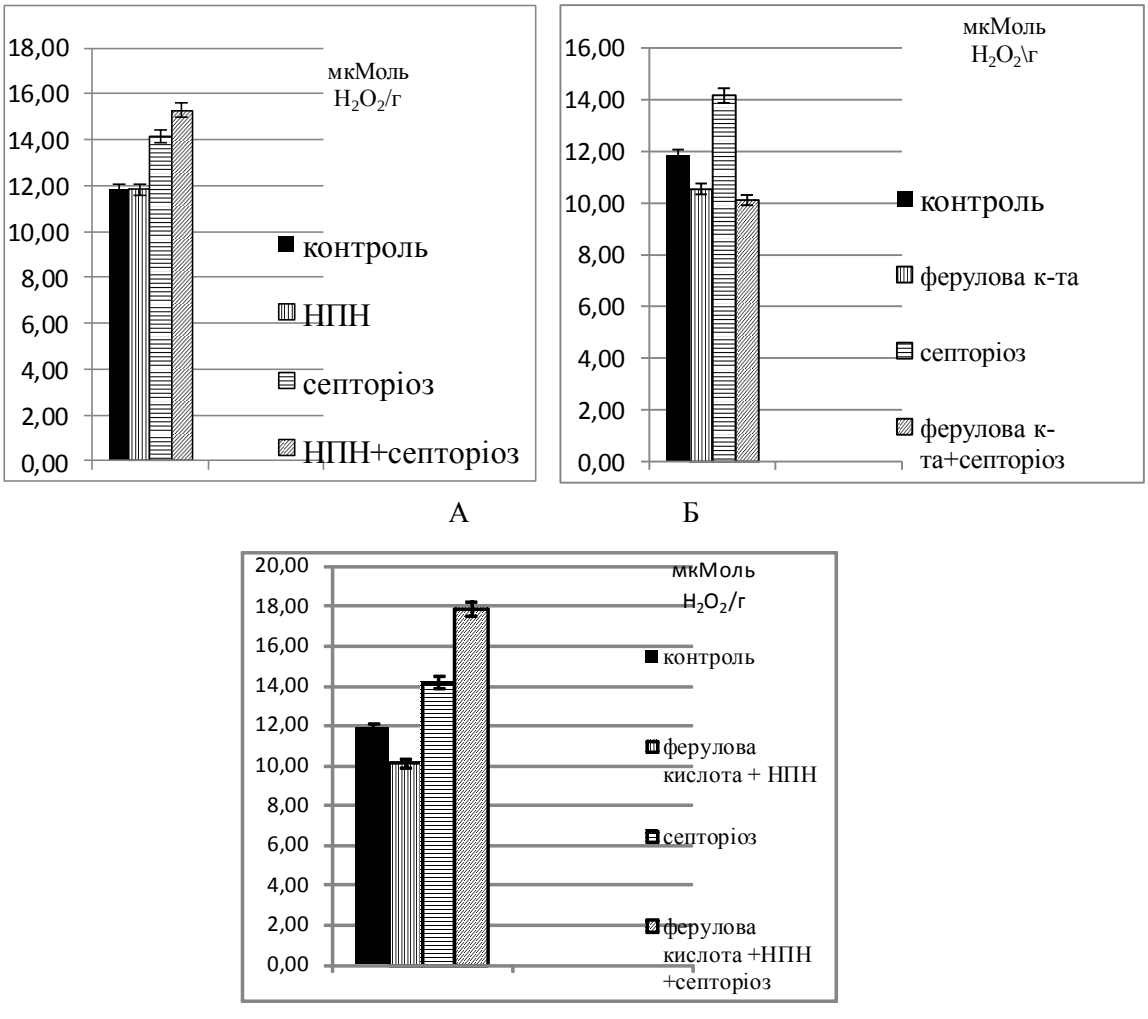

Рис. 1. Вміст ендогенного пероксиду водню в прапорцевих листках пшениці озимої сорту Світанок миронівський за обробки нітропрусидом натрію (НПН) (А), феруловою кислотою (Б), разом обома речовинами (В) за ураження септоріозом листків пшениці.

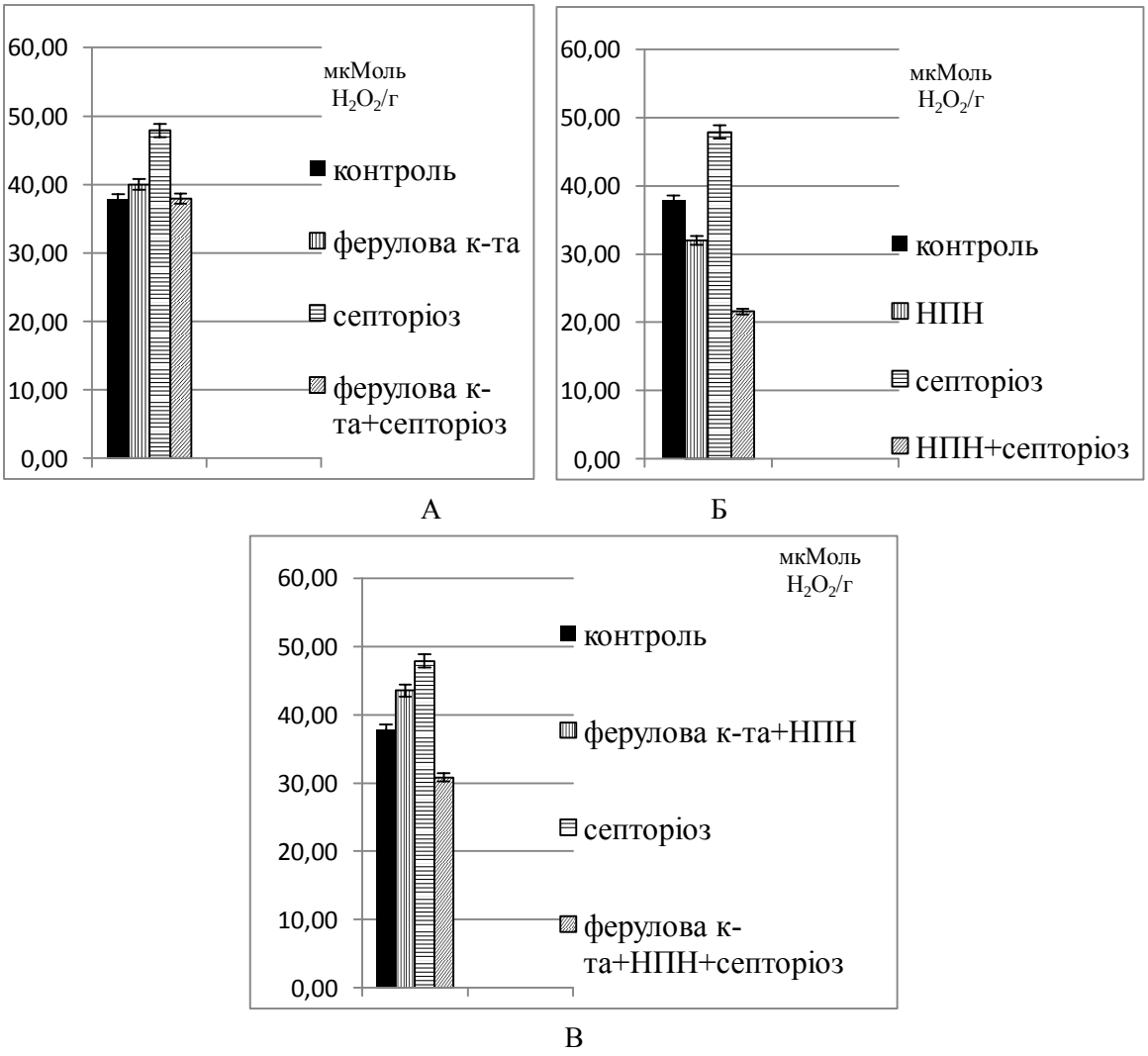

Рис. 2. Вміст ендогенного пероксиду водню в прапорцевих листках пшениці озимої сорту Оберіг миронівський за обробки феруловою кислотою (А), нітропрусидом натрію (НПН) (Б), сумісразомно обома речовинами (В) та за ураження септоріозом листків пшениці.

У фазу молочно-воскової стиглості зерна прояви розвитку септоріозу листків пшениці найбільш помітні та діагностуються візуально, при цьому зрілі тканини листка припиняють свій ріст, однак зберігають фотосинтетичну активність. Ураження збудником цього грибного захворювання листків пшениці озимої без обробки біотичним еліситором та донором сигнальної молекули призводило до зниження площі фотосинтетично активної поверхні, внаслідок чого зменшується забезпечення фотоасимілятами колоса та продуктивність рослин. Показано, що в умовах польових дослідів комбінована обробка біотичним еліситором та донором сигнальної молекули NO здійснювала ефект пролонгації функціонування фотосинтетичного апарату, що проявлялося візуально у більш тривалому збереженні зеленого забарвлення листків у фазу молочно-воскової стиглості зерна в обох досліджених сортів – як сприйнятливого Оберіг миронівський, так і помірно стійкого Світанок миронівський. За результатами оцінки ступеня ураження за шкалою Саарі-Прескотта показано, що ферулова кислота в якості біотичного еліситора та у комбінації з донором оксиду азоту знижувала ступінь ураження листків пшениці озимої сортів Світанок миронівський та Оберіг миронівський за інфікування збудником септоріозу листків пшениці на 1–2 бали. Сорт Світанок миронівський виявився більш толерантним до ураження грибними захворюваннями, помірно стійким за візуальної діагностики, сорт Оберіг миронівський охарактеризовано як сприйнятливий, він продемонстрував вищу чутливість

до впливів біотичного еліситора та грибного патогену.

Показано, що висота рослин у сприйнятливого сорту пшениці озимої Оберіг миронівський суттєво знижувалася за ураження *Septoria tritici Rob et Desm.* При цьому стимуляція росту інфікованих рослин у висоту достовірно встановлена за сумісної обробки біотичним еліситором феруловою кислотою та розчином нітропрусиду натрію – донору сигнальної молекули монооксиду азоту. Отриманий ефект є синергічним, оскільки за умов застосування обох речовин окремо вплив не був таким значним.

Встановлено, що у помірно стійкого сорту пшениці озимої Світанок миронівський стимуляція росту за впливу ферулової кислоти та донора монооксиду азоту була більш значною, ніж у сприйнятливого сорту Оберіг миронівський як у інфікованих збудником септоріозу листках рослин пшениці, так і у інтактних рослинах. Крім того, ріст у сорту Світанок миронівський виявився більш чутливим до дії ферулової кислоти, ніж у сорту Оберіг миронівський. Показано, що сумісний вплив обох речовин підвищував висоту рослин за ураження листків пшениці озимої сорту Оберіг миронівський *Septoria tritici Rob et Desm.* до рівня навіть вищого за контроль.

Комбінація донора монооксиду азоту та ферулової кислоти також стимулювала ріст прапорцевих листків у довжину в обох досліджених сортів та індукувала реалізацію потенційної врожайності пшениці озимої за умов фітопатогенного навантаження на посіви за рахунок збільшення маси та кількості зерен. Ефективність дії біотичного еліситора за поєднання з донором NO зростала на 5–10 %, загальна продуктивність підвищувалась у обох сортів на 15–25 %.

Відомо, що до переходу збудника у некротрофну фазу його розвиток повільний, і перші візуальні прояви ураження сигналізують про зміну типу метаболізму гриба [9]. Ферулова кислота як одна з оксикоричних кислот, що входять до складу лігніну, є неодмінним компонентом клітинної стінки. Ймовірний механізм реакції на її надходження внаслідок екзогенної обробки може включати сприйняття її рослиною як сигналу про руйнування клітинної стінки внаслідок проникнення інфекційного агената.

Екзогенна ферулова кислота є сильним антиоксидантом та ймовірним джерелом сировини для побудови клітинної стінки і ліквідації ушкоджень, спричинених збудниками грибних захворювань.

Продукування пероксиду водню під час окиснювального вибуху, викликаного проникненням фітопатогена, як відомо, є кальцій-залежним процесом та слугує для передачі сигналу в геном [10]. Ймовірно, що зміни у пулі ендогенного пероксиду водню активують каскад мітоген-активних протеїнкіназ, модифікують ферментативну активність та фактори регуляції транскрипції [11–12].

Таким чином, сприйнятливий сорт Оберіг миронівський реагував великим зниженням – на 55 % – пулу ендогенного пероксиду водню в інфікованих збудником септоріозу рослин за індукції неспецифічного імунітету донором оксиду азоту та феруловою кислотою, у той час як у більш помірно стійкого сорту Світанок миронівський була тенденція до зростання вмісту ендогенного пероксиду водню в прапорцевих листках за тих же умов.

Отже, реакція рослин пшениці озимої на індукцію неспецифічного імунітету до грибного фітопатогена – збудника септоріозу листя *Septoria tritici Rob et Desm.* – шляхом обробки біотичним еліситором феруловою кислотою та донором сигнальної молекули NO значною мірою залежала від генетичних характеристик сорту. Показано, що активація антиоксидантної системи захисту зменшувала прояви симптомів захворювання в обох сортів, стимулювала ріст та реалізацію потенційної продуктивності.

Висновки

У польових дослідах показано, що комбінація донора NO та ферулової кислоти знижувала ураження листків *Septoria tritici Rob et Desm.* на 1–2 бали за шкалою Саарі-Прескотта в обох досліджених сортів пшениці озимої: у помірно стійкого сорту Світанок миронівський ендогенний пул пероксиду водню підвищувався на 8 % за дії оксиду азоту, за впливу ферулової кислоти знижувався на 21 %, та зростав на 27 % за сумісної обробки обома речовинами. У більш сприйнятливого сорту Оберіг миронівський помічено зменшення пулу ендогенного пероксиду водню в інфікованих збудником септоріозу листках на 55 % за дії оксиду азоту, на 21 % – за впливу ферулової кислоти та за їх сумісної дії – на 55 %. Відзначена стимуляція ростових процесів та реалізації формування врожайності у пшениці озимої в обох сортів.

Таким чином, індукція неспецифічного імунітету пшениці озимої до грибного патогену за застосування комбінації біотичного еліситора з сигнальною молекулою здійснюється через антиоксидантну систему захисту, що стимулює ріст рослин та формування врожаю за фітопатогенного навантаження; ефективність обробки значно зростає, однак реалізація дії обох речовин залежить від генотипу сорту пшениці.

Література

1. Дмитрієв О.П., Ковбасенко Р.В., Авдєєва Л.В., Лапа С.В., Ковбасенко В.М. Сигнальні системи рослин та формування стійкості до біотичного стресу. К.: Фенікс, 2015. 192 с.
2. Тютерев С.Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам. *Вестник защиты растений.* 2015. 1 (83). С. 3–13.
3. Жук І.В., Дмитрієв О.П., Лісова Г.М. Специфіка дії еліситорів на макроморфогенез у *Triticum aestivum* за умов одночасного ураження *Septoria tritici* та *Puccinia recondita*. *Modern Phytomorphology*. 2016. Vol. 10. P. 117–123. doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.155369.
4. Жук І.В., Дмитрієв О.П., Лісова Г.М. Роль пероксидази у формуванні індукованої стійкості рослин пшениці за допомогою імуномодуляторів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К.: Логос, 2016. Т. 18. С. 81–84.
5. Жук І.В., Лісова Г.М., Дмитрієв О.П. Вплив щавлевої кислоти та нітропрусиду натрію на продуктивність і стійкість озимої пшениці до збудників септоріозу та бурої іржі *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія.* 2017. Вип. 2 (41). С. 68–76.
6. Жук І.В., Дмитрієв О.П., Лісова Г.М., Кучерова Л.О. Участь ферулової кислоти в індукуванні стійкості рослин озимої пшениці проти збудника септоріозу. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* Т. 20. С. 190–193.
7. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22. P. 867–880.
8. Бабаянц О.В, Бабаянц Л.Т. Основы селекции и методологии оценки устойчивости пшеницы к возбудителям болезней. Одесса: ВМВ, 2014. 401 с.
9. Rudd J.J., Kanyuka K., Hassani-Pak K., Derbyshire M., Andongabo A., Devonshire J., Lysenko A., Saqi M., Desai N.M., Powers S.J., Hooper J., Ambroso L., Bharti A., Farmer A., Hammond-Kosack K.E., Dietrich R.A., Courbot M. Transcriptome and metabolite profiling of the infection Cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiology*, March 2015. Vol. 167. P. 1158–1185. doi: https://doi.org/10.1104/pp.114.255927.
10. Kao Y.-T., Gonzalez K.L., Bartel B. Peroxisome function, biogenesis, and dynamics in plants. *Plant Physiology*, January 2018. Vol. 176. P. 162–177. doi: https://doi.org/10.1104/pp.17.01050.
11. Moural T.W., Lewis K.M., Barnaba C., Zhu F., Palmer N.A., Sarath G., Scully E.D., Jones J.P., Sattler S.E., Kang Ch.H. Characterization of class III peroxidases from switchgrass. *Plant Physiol.* Jan 2017. Vol. 173 (1). P. 417–433. doi: https://doi.org/10.1104/pp.16.01426.
12. Schmidt R., Kunkowska A.B., Schippers J.H.M. Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves. *Plant Physiol.* Dec. 2016. 72 (4). P. 2098–2106. doi: https://doi.org/10.1104/pp.16.00426.

References

1. Dmitriev A.P., Kovbasenko R.V., Avdeeva L.V., Lapa S.V., Kovbasenko V.M. Signal systems of plants and tolerance formation against biotic stress. Kyiv: Fenix, 2015. 192 p.
2. Tyuterev S.L. Ecologically safe elicitors of plant tolerance to diseases and physiological stresses. *Plant Protection News.* 2015. Vol. 1 (83). P. 3–13.
3. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M. The specifics of elicitor effect on *Triticum aestivum* L. macromorphogenesis under simultaneous lesion by *Septoria tritici* and *Puccinia recondite*. *Modern Phytomorphology*. 2016. Vol. 10. P. 117–123. doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.155369.
4. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M. Rol` peroksy`dazy` u formuvanni indukovanoyi stijkosti rosly`n psheny`ci za dopomogoyu imunomodulyatoriv. *Factors in experimental evolution of organisms*. K.: Logos, 2016. Vol. 18. P. 81–84.
5. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M. The influence of oxalic acid and sodium nitroprusside on winter wheat productivity and tolerance to septoria leaf blotch and rust. *Bulletin of Kharkiv National agrarian university. Biology*. 2017. Vol. 2 (41). P. 68–76.
6. Zhuk I.V, Dmitriev A.P., Lysova G.M., Kucherova L.O. Participation of ferulic acid in elicitation of winter wheat plants resistance against *Septoria tritici* infection. *Factors in experimental evolution of organisms.* 2017. Vol. 20. P. 190–193.
7. Babayants O.V., Babayants L.T. Basis of selection and methodology of wheat tolerance estimation to diseases agents. Odessa, 2014. 401 p.
8. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22. P. 867–880.
9. Rudd J.J., Kanyuka K., Hassani-Pak K., Derbyshire M., Andongabo A., Devonshire J., Lysenko A., Saqi M., Desai N.M., Powers S. J., Hooper J., Ambroso L., Bharti A., Farmer A., Hammond-Kosack K.E., Dietrich R.A., Courbot M. Transcriptome and metabolite profiling of the infection Cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiology*, March 2015. Vol. 167. P. 1158–1185. doi: https://doi.org/10.1104/pp.114.255927.

10. Kao Y.-T., Gonzalez K.L., Bartel B. Peroxisome function, biogenesis, and dynamics in plants. *Plant Physiology*, January 2018. Vol. 176, P. 162–177. doi: https://doi.org/10.1104/pp.17.01050.
11. Moural T.W., Lewis K.M., Barnaba C., Zhu F., Palmer N.A., Sarath G., Scully E.D., Jones J.P., Sattler S.E., Kang Ch.H. Characterization of class III peroxidases from switchgrass. *Plant Physiol.* Jan 2017. Vol. 173 (1). P. 417–433. doi: https://doi.org/10.1104/pp.16.01426.
12. Schmidt R., Kunkowska A.B., Schippers J.H.M. Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves. *Plant Physiol.* Dec. 2016. 72 (4). P. 2098–2106. doi: https://doi.org/10.1104/pp.16.00426.

ZHUK I.V.[1], DMITRIEV A.P.[1], LYSOVA G.M.[2], KUCHEROVA L.O.[2]
[1] Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Natl. Acad. Sci. Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: ivzhukvi@gmail.com
[2] Institute of Plant Protection of Natl. Acad. Agrar. Sci. Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkyvska str., 33, e-mail: mail_gl@ukr.net

THE COMBINATION OF NO DONOR AND FERULIC ACID EFFECT ON THE ELICITATION OF *TRITICUM AESTIVUM* TOLERANCE AGAINST *SEPTORIA TRITICI*

Aim. The aim is to research the ability of enhancing ferulic acid effect as a biotic elicitor to induce tolerance of winter wheat plants against *Septoria tritici Rob et Desm.* leaf blotch infection by addition donor of NO signal molecule. ***Methods.*** Content of endogenous H_2O_2 was measured in wheat leaves (cv. Oberig myronivskij and Svytanok myronivskij). The extent of disease development, morphometric parameters and yield structure were analyzed. ***Results.*** It is shown that combination of treatment by ferulic acid with NO donor reduced the disease symptoms on 1–2 points. The level of endogenous hydrogen peroxide increased on 27 % in cv. Svytanok myronivskij. ***Conclusions.*** The data obtained suggest that combination of ferulic acid with donor NO could be used as more effective combination than biotic elicitor. They decreased the degree of lesions in leaf area caused by *Septoria tritici Rob et Desm.* leaf blotch infection and stimulated the growth of wheat plants. The analyze of biochemical mechanisms revealed that system resistance of wheat plants is induced via activation of antioxidant protection.
Keywords: ferulic acid, NO, biotic elicitors, induced resistance, *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici Rob et Desm.*