

На правах рукописи



ЗАХАРЕНКОВА Татьяна Сергеевна

**Антагонистические взаимодействия патогенного гриба и растения
в инфекционной капле, связанные с активацией кислорода**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в группе биофизики Учреждения Российской академии сельскохозяйственных наук Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии, с. Большие Вяземы Московской области.

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Аверьянов Андрей Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

профессор

Балнокин Юрий Владимирович

кандидат биологических наук

Бабоша Александр Валентинович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им А.Н. Баха РАН

Защита состоится «22» февраля 2011 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.Д. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru, ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Автореферат разослан « 15 » января 2011 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций
кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Антагонистические взаимодействия растения с возбудителями болезней надземной части начинаются на его поверхности в инфекционной капле, то есть капле воды, содержащей инфекционное начало. Эта стадия заражения во многом определяет его дальнейшее течение и исход. Здесь микроорганизмы вступают в разнообразные отношения между собой и с растением-хозяином, в том числе и в биохимические, в которых важную роль играют противостоящие друг другу активные формы кислорода (АФК) и антиоксиданты. Некоторые аспекты взаимодействия в инфекционной капле, в том числе, связанные с этими веществами, заслуживают более подробного изучения.

Это, например, влияние самой воды инфекционной капли на взаимоотношения растений с патогенами. Хорошо известно, что капельно-жидкая влага необходима для заражения надземной части (Тарр, 1975). Однако не исключено, что растения при частом поверхностном увлажнении могут адаптироваться, становясь, напротив, более устойчивыми. В литературе есть лишь косвенные указания на такую возможность. Если устойчивость, индуцированная водой, действительно, существует, то представляет интерес ее механизм, в том числе, участие в нем АФК.

Противоинфекционная роль АФК опосредована, в частности, элиситорами, индуцирующими окислительный взрыв и другие защитные реакции. Возможна и противоположная ситуация, когда АФК хозяина стимулируют выделение элиситоров паразитом. Эта способность может быть проявлением болезнеустойчивости, поскольку диффундирующие элиситоры, по-видимому, раньше, чем связанные, индуцируют защитные реакции (Метлицкий и др., 1973). Ранее показано, что споры гриба *Magnaporthe grisea*, возбудителя пирикуляриоза риса, под действием экзогенной перекиси водорода выделяют вещества, индуцирующие противоинфекционные реакции каллусов риса устойчивого сорта (Лапикова и др., 2000). Представляло интерес выяснить, происходит ли это с интактными растениями и как связано с их болезнеустойчивостью. Кроме того, поскольку споры и сами образуют АФК (Aver'yanov *et al.*, 2007), следовало выяснить, как это явление влияет на выделение спорных элиситоров.

Антиоксиданты патогенных микроорганизмов, снижая концентрацию АФК, ослабляют АФК-зависимые защитные реакции растений и потому являются факторами патогенности. Со своей стороны, растения способны ингибировать некоторые

другие факторы патогенности, например, литические ферменты (Дьяков и др., 2001). Не исключено, что такой антагонизм затрагивает и чужеродные антиоксиданты. Действительно, супероксиддисмутаза (СОД) после контакта с листьями риса перестает ослаблять супероксидзависимую фунгитоксичность их диффузата (Аверьянов, Лапикова, 1989). Это явление следовало изучить подробнее.

Цель и задачи работы. Целью было выяснение роли АФК, антиокислительных ферментов и элиситоров на ранней стадии взаимодействия растений и патогенных грибов, а именно в инфекционной капле в связи с болезнеустойчивостью. Задачи включали:

1. Оценку влияния длительного поверхностного увлажнения листьев на локальную и системную болезнеустойчивость растений. Выяснение возможного участия АФК в этом явлении;
2. Выяснение возможности выделения элиситоров из грибных спор под действием АФК, добавленных извне или образованных самими спорами;
3. Исследование возможного влияния растения на чужеродные антиоксиданты в связи с болезнеустойчивостью.

Научная новизна работы. Впервые описана болезнеустойчивость растений, двудольного (огурец) и однодольного (рис), индуцированная поверхностным увлажнением их надземной части до заражения. В первом случае устойчивость проявлялась и локально, и системно, а во втором – только локально. На рисе возникновению устойчивости предшествовало и могло быть ее причиной увеличение образования супероксидного радикала (O_2^-) листьями.

Обнаружена элиситорная активность экзометаболитов спор *M. grisea*, проявлявшаяся на интактных растениях риса устойчивого, но не восприимчивого сорта. Она была следствием образования АФК спорами и усиливалась в присутствии экзогенных АФК. Для элиситорной активности был необходим одновременный контакт листьев с низко- и высокомолекулярными экзометаболитами спор.

Описанная ранее (Аверьянов, Лапикова, 1989) потеря способности медьцинковой СОД после контакта с листьями риса детоксицировать O_2^- подтверждена на том же и выявлена на других устойчивых сортах, а также в искусственной O_2^- - генерирующей системе. Представлены данные, согласно которым экзогенный фермент, а именно ион меди его активного центра, может индуцировать выделение лис-

том соответствующего ингибитора, и что этим ингибитором может быть салициловая кислота.

Практическая ценность работы. Работа является фундаментальной, но указывает возможные направления прикладных разработок. Так, при опрыскивании надземных частей растений следует учитывать, что вода, содержащаяся в агрохимических препаратах, может повышать фоновую продукцию АФК растениями и этим влиять на эффект действующего вещества, которое, в свою очередь, может влиять на эффект воды.

Выявленная способность АФК вызывать выход грибных элиситоров может стать основой для поиска маркеров и индукторов устойчивости.

В качестве средств защиты растений, вероятно, могут применяться также экзогенные ингибиторы антиоксидантов патогена или вещества, активирующие синтез или выделение аналогичных ингибиторов растением.

Экспериментальные данные и теоретические обобщения диссертации могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических факультетов вузов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены: на 15-м FESPB (Federation of European Societies of Plant Biology) Конгрессе 17-21 июля 2006, Лион, Франция; на Международном симпозиуме «Non-specific innate and acquired plant resistance», 31 августа – 3 сентября 2006, Будапешт, Венгрия; на 15-м International Reinhardsbrunn Symposium «Modern Fungicides and Antifungal Compounds», 6-10 мая 2007, Фридрихрода, Германия; на SFFR Plant Oxygen Group Meeting «ROS in Plants. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants», Гент, Бельгия, 12-14 сентября, 2007; на 9-ом International Congress of Plant Pathology, 24-29 августа, 2008; на SFFR Plant Oxygen Group Meeting on Reactive Oxygen and Nitrogen Species «Plant ROS 2009», 8-10 июля, 2009, Хельсинки, Финляндия; на Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс», 9-12 ноября 2010, Москва.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ.

Работа была частью российско-американского проекта № 2682р «Прооксидантное/антиоксидантное состояние инфекционной капли в связи с болезнеустойчивостью растений» Международного научно-технического центра. Основные положения диссертации изложены в квартальных и годовых отчетах по проекту и обсуждались с

американским коллаборатором К. Дж. Бейкером (лаборатория молекулярной патологии растений, служба сельскохозяйственных исследований Департамент сельского хозяйства США, Белтсвилл, Мериленд, США).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов, методов и результатов исследований, выводов, заключения и списка литературы. Материал изложен на 146 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 41 рисунок. Список использованной литературы включает 188 работ, из которых 115 на английском языке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований. Растения огурца (*Cucumis sativus* L.) восприимчивого сорта Феникс выращивали до стадии семядолей (7 дней) или первого настоящего листа (14 дней). Растения риса восприимчивого сорта Sha-tiao-tsau и устойчивого Zenith выращивали до стадии четырех полностью развернутых листьев (21-33 суток). Первичные каллусы риса сорта Zenith были выращены из зрелых семян риса (Belyanskaya, Shamina, 1993) на агаризованной среде Мурасиге-Скуга. Использовали первый пассаж (20-25 дней).

Возбудителя оливковой пятнистости огурца, гриб *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth. изолят С5, культивировали при 25°C на картофельно-глюкозном агаре. Для опытов брали 10-дневную культуру гриба. Возбудителя пирикулярриоза риса, гриб *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr изолят Н5-3 (раса 007), поддерживали при 28°C на агаризованном морковном отваре с кусочками листьев риса восприимчивого сорта. Для опытов брали 6-16 суточную культуру.

Споры смывали дистиллированной водой, промывали и концентрировали на мембранном фильтре 8 мкм (*C. cucumerinum*) или центрифугированием 10 мин при 8000 g (*M. grisea*).

Предобработка растений огурца водой, их инокуляция и оценка симптомов болезни. Наносили 10 капель воды (по 10 мкл) на первый лист до появления остальных или по 5 капель на каждую семядолю до появления листьев или опрыскивали все растение водой (0.5 мл). Обработанные растения помещали в увлажненный бокс на 24 ч. Затем заражали каплями суспензии *C. cucumerinum* (10^5 спор/мл) пер-

вый лист (сразу или через 7 дней) или второй (через 7 дней) или третий (через 12 дней) листья. Зараженные растения оставляли на 24 ч в темноте при 18°C в том же боксе.

Визуальные симптомы болезни оценивали через 5-11 дней после заражения. Некоторые капли инокулюма не оставляли видимых симптомов, другие вызывали хлорозы – симптомы слабой восприимчивости или некрозы – сильной восприимчивости. Подсчитывали соотношение этих признаков.

Предобработка растений риса водой, их инокуляция и оценка симптомов болезни. Четвертые листья полностью интактных проростков фиксировали горизонтально в инокуляционных камерах (Лапикова и др., 1995). На верхнюю поверхность листьев наносили по 6 капель дистиллированной воды (по 20 мкл) с помощью капледержателей (Аверьянов, Лапикова, 1989) и для локального увлажнения воздуха закрывали камеры крышками. В других случаях листья опрыскивали или погружали в пробирки с водой. Через 17-22 часа капли собирали каплесборником (Аверьянов, Лапикова, 1989) или извлекали листья из пробирок, давали листьям высохнуть и заражали их каплями суспензии (10^5 спор/мл) *M. grisea*, используя ту же технику. Затем растения инкубировали 24 ч в темноте.

Визуальные симптомы оценивали (Latterell *et al.*, 1965) через 7-13 дней после заражения. Симптомы совместимости – это большие (длиной 4 мм и более) желтовато-серые пятна, симптомы несовместимости – мелкие (до 2–3 мм) бурые точки или отсутствие симптомов. Подсчитывали соотношение этих признаков.

Получение диффузатов листьев риса и анализ в них супероксидного радикала. Капли инокулюма или воду после инкубации на листьях собирали и центрифугировали (17 000 g, 10 мин). Продукцию O_2^- оценивали по СОД-чувствительному окислению экзогенного адреналина (Bors *et al.*, 1987). В лунки 384-ячеистой пластины вносили по 35 мкл диффузата, 5 мкл 20 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.8) и 5 мкл воды или 50 мкг/мл СОД. Реакцию начинали добавлением 5 мкл 1 мМ адреналина и оценивали при A_{480} на спектрофотометре Biorad Benchmark Plus.

Оценка фунгитоксичности диффузатов листьев риса. В лунки 96-луночной пластины вносили по 40 мкл воды или диффузатов листьев, 5 мкл воды и 5 мкл суспензии (3.5×10^4 спор/мл) спор *M. grisea*. Пластины инкубировали 5 ч в темноте при

23 °С. Затем споры фиксировали этанолом. Их прорастание считали под инвертированным микроскопом в 4 повторностях по 100 спор.

Получение диффузатов спор *M. grisea* и предобработка ими растений риса.

Споры (10^5 спор/мл) инкубировали 5 ч в воде или 50 мкМ H_2O_2 в темноте при 23°С. Затем добавляли 20 мкг/мл каталазы для разрушения перекиси и еще через 1 час суспензию центрифугировали (10 мин при 17000 g и 4°С) и кипятили супернатант для инактивации каталазы. В других случаях споры проращивали в воде или в растворе 20 мкг/мл СОД или каталазы. Затем диффузаты спор центрифугировали, кипятили и помещали каплями на листья риса.

В ряде случаев диффузаты спор после кипячения разделяли центрифугированием (17000 g, 30 мин) в фильтрующих мембранных патронах с порами 3 кД.

Оценка прорастания спор *S. cucumerinum* и анализ O_2^- в их диффузатах.

Споры *S. cucumerinum* в разных концентрациях (5×10^3 , 10^4 , 10^5 или 5×10^5 спор/мл) 20 ч проращивали в 96-луночных пластинах (по 100 мкл суспензии в лунке) при 18 или 25°С. Часть спор фиксировали этанолом и считали их прорастание.

Образование O_2^- в диффузатах спор анализировали по окислению экзогенного адреналина, чувствительному к СОД, как описано выше.

Оценка влияния листьев риса на способность экзогенных антиоксидантов ослаблять фунгитоксичность диффузатов листьев. На листья наносили в смеси с суспензией спор (10^5 спор/мл) *M. grisea* различные растворы: 50 мкг/мл CuZn-СОД, Fe-СОД, Mn-СОД или БСА или по 3.2 мкМ $CuCl_2$, $ZnCl_2$ или $MnSO_4$, или 1 мМ тайрона, или 10 мМ маннита, или 30 мМ 1,3-диметил-2-тиомочевины. В полученные таким образом диффузаты перед анализом их фунгитоксичности добавляли (или нет) вторую порцию вышеназванных веществ в тех же концентрациях.

Оценка влияния листьев риса на способность экзогенной СОД ослаблять фунгитоксичность O_2^- -генерирующей системы. Модельную фотохимическую систему рибофлавин-метионин (Аверьянов и др., 2000) добавляли в лунки 96-ячеистой пластины вместе со спорами (3.5×10^4 спор/мл) *M. grisea*. Туда же добавляли (или нет) свежерастворенную или проинкубированную на листьях СОД. Пластины освещали 0.5 ч при 4-5 клк, затем выдерживали 4.5 ч в темноте и фиксировали споры.

Оценка химической активности СОД. Измеряли активность фермента по торможению восстановления нитросинего тетразолия (NBT) в ксантинооксидазной

системе (Beauchamp, Fridovich, 1971) при A_{560} на спектрофотометре Biorad Benchmark Plus.

Получение диффузатов каллусов риса и оценка их фунгитоксичности. В пластмассовые чашки Петри помещали 100 мг каллусов риса и 2 мл суспензии спор *M. grisea* (10^5 спор/мл), содержащей (или нет) 50 мкг/мл CuZn-СОД или воды. Через 8 ч жидкую фазу центрифугировали и добавляли в нее СОД в той же концентрации или воду и оценивали фунгитоксичность.

Статистическая обработка данных. Вычисляли средние значения для всех повторностей одного или нескольких опытов, а также стандартное отклонение (SD) (рис.3, 4, 5, 6, 9 и табл. 1, 3, 4), или стандартную ошибку (SE) (рис.1 и табл. 2), или доверительный интервал. Последний считали по критерию Стьюдента для вероятности 0.99 ($P=0.01$) (рис.8). Звездочками на рис.1 отмечены значения, достоверно отличающиеся от необработанного контроля при 0.95 ($P=0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние длительного увлажнения листьев огурца на его устойчивость

к оливковой пятнистости

Если капли воды инкубировали одни сутки на первом настоящем листе, а затем его заражали, то болезнь проявлялась слабее, чем в неувлажненном варианте (рис. 1а). Это же наблюдалось, если заражали второй (рис. 1б) или третий лист (соответственно, через 7 или 12 дней после обработки первого листа водой) или же обрабатывали семядоли, а заражали первый лист.

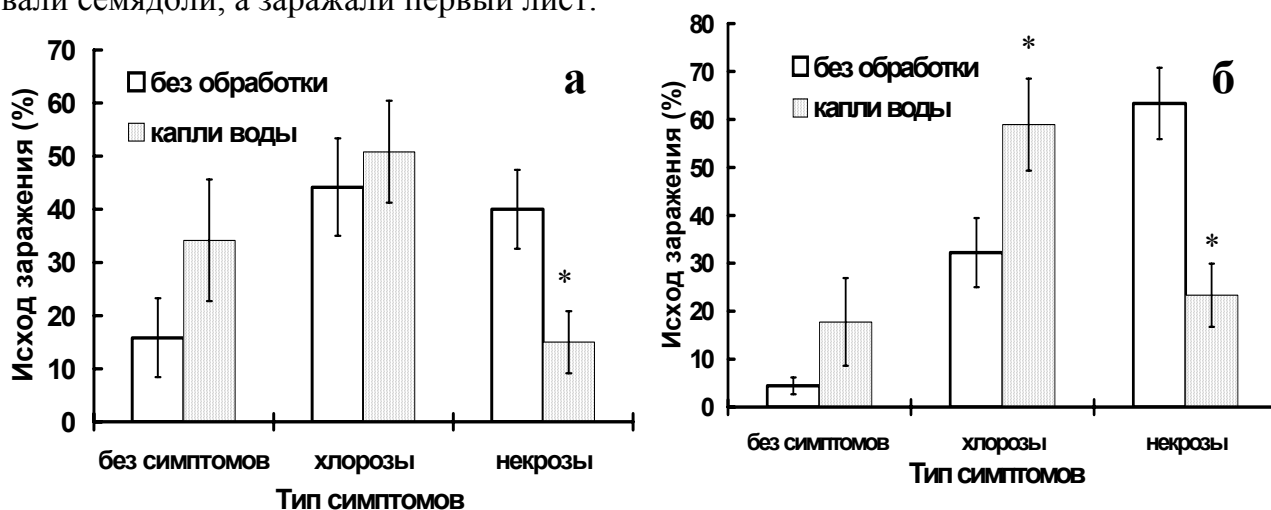


Рис.1. Влияние 24-часовой инкубации капель воды на первом листе огурца восприимчивого сорта на симптомы последующего заражения того же (а) или второго листа (б) оливковой пятнистостью.

Следовательно, предобработка водой способствовала как локальной, так и системной болезнеустойчивости, которая развивалась во вновь образованном листе. Интересно было выяснить, наблюдается ли это явление в других патосистемах.

2. Влияние предобработки водой на визуальные симптомы пирикулярриоза риса

Инкубация крупных капель воды на четвертом листе риса до его заражения ослабляла тяжесть болезни (рис. 2). Эффективно было также опрыскивание листа и выпадение на нем конденсата из влажного воздуха, но не погружение листа в пробирку с водой.

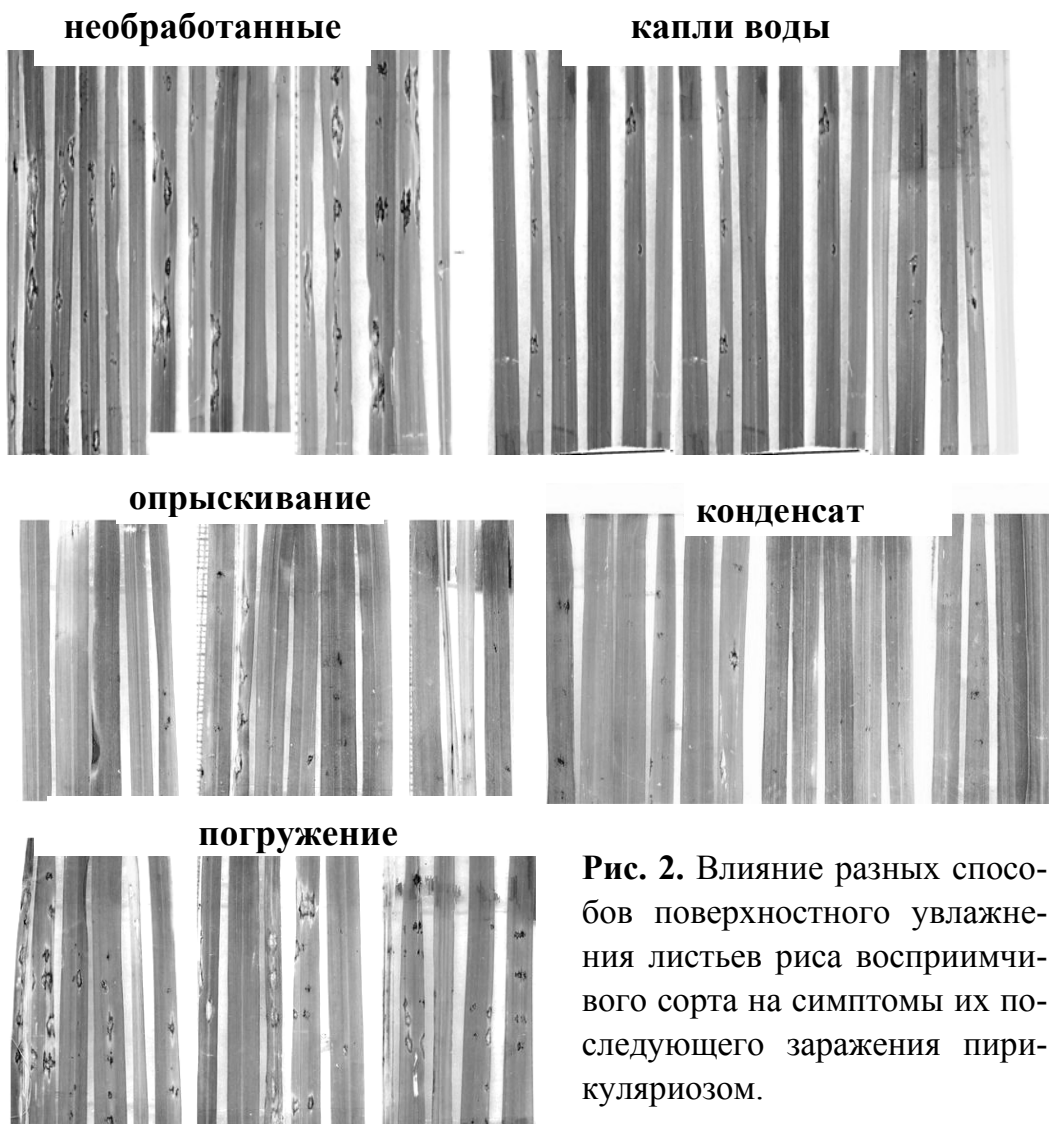


Рис. 2. Влияние разных способов поверхностного увлажнения листьев риса восприимчивого сорта на симптомы их последующего заражения пирикулярриозом.

Следовательно, поверхностное увлажнение листа риса, но только небольшим объемом воды, вызывало локальную устойчивость к пирикулярриозу. Мы предполагаем, что вода при длительном контакте освобождает из клеточных стенок растительные элиситоры, индуцирующие в таком состоянии защитные реакции. Возможно, что элиситоры из погруженного листа не были эффективны из-за их чрезмерного разбавления. Предобработка водой не вызывала системной болезнестойчивости риса.

Таким образом, поверхностное увлажнение надземной части индуцировало локальную болезнестойчивость как однодольного, так и двудольного растения, и системную – двудольного. Мы попытались выявить возможное участие АФК в механизме этой устойчивости.

3. Влияние предобработки водой на образование супероксидного радикала в диффузатах листьев риса и их фунгитоксичность

Предобработка водой стимулировала окисление экзогенного адреналина в диффузате незараженных листьев восприимчивого сорта по сравнению с необработанным контролем (рис. 3). Реакция подавлялась экзогенной СОД, свидетельствуя об образовании O_2^- . У устойчивого сорта предобработка водой увеличивала этот показатель только в диффузатах зараженных листьев.

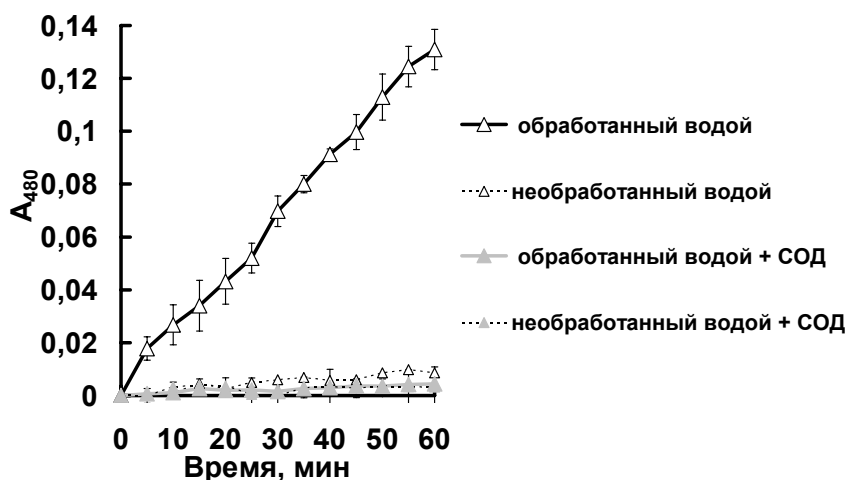


Рис. 3. Генерация супероксидного радикала (по окислению экзогенного адреналина) в диффузатах незараженных листьев риса восприимчивого сорта, необработанных и обработанных водой.

Предобработка листьев водой не увеличивала токсичности их диффузатов для спор возбудителя. Следовательно, если АФК участвуют в индуцированной водой болезнестойчивости, то, вероятно, как сигнальные молекулы, а не токсиканты.

Итак, длительный поверхностный контакт листьев риса с водой увеличивает фоновую продукцию O_2^- в инфекционной капле, что предшествует возникновению болезнестойчивости и, возможно, является ее причиной. Различные реакции воспри-

имчивого и устойчивого сортов, вероятно, связаны с их чувствительностью к собственным и грибным элиситорам. Интересно было выяснить, может ли повышенный уровень АФК вызывать выход элиситоров из спор.

4. Визуальные эффекты обработки листьев риса диффузатами грибных спор

Чтобы выявить возможное элиситорное действие споровых диффузатов на интактные растения, споры проращивали в воде или 50 мкМ H_2O_2 , которая, как выяснено, не ингибировала прорастания. Действительно, в обоих случаях диффузаты вызывали мелкие некротические пятна (признак устойчивости) на листьях устойчивого, но не восприимчивого сорта риса. Если обработанные листья заражали, то на устойчивом сорте симптомов не было, как и без обработки. На восприимчивом сорте диффузаты спор достоверно не изменяли тяжесть болезни по сравнению с обработанными водой. Следовательно, если элиситорные свойства споровых диффузатов четко проявлялись, то только на устойчивом сорте.

5. Влияние диффузатов спор на образование супероксидного радикала в диффузатах листьев риса

Мы попытались выявить еще одну защитную реакцию – генерацию O_2^- . Результаты согласуются с полученными ранее. Инкубация на листьях диффузата спор, проросших в воде, стимулировала окисление адреналина на устойчивом (R), но не восприимчивом (S) сорте (рис. 4).

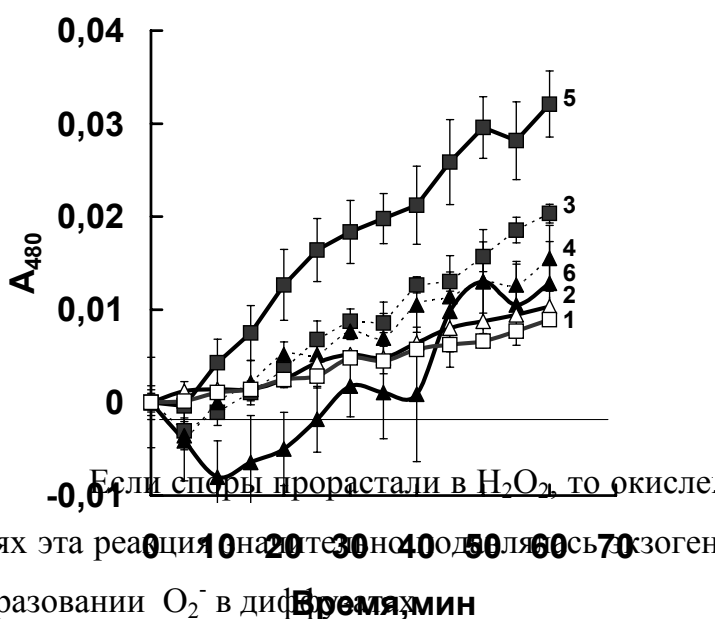


Рис. 4. Генерация O_2^- (по окислению экзогенного адреналина) в диффузатах незараженных листьев риса разных сортов после нанесения на них воды (1-Zenith, 2-Shatiaotsao) или диффузатов спор, проросших в воде (3-Zenith (R), 4-Shatiaotsao (S)) или в 50 мкМ H_2O_2 (5-Zenith (R), 6-Shatiaotsao (S)). Отрицательные величины означают окисление в диффузате, более медленное, чем в воде.

Если эта реакция на адреналин обусловлена экзогенной СОД, что свидетельствует об образовании O_2^- в диффузатах, то окисление адреналина в диффузатах спор, проросших в H_2O_2 , будет быстрее, чем в воде.

Полученные факты подтверждают предположение, что экзогенные АФК, в том числе образованные растением, могут стимулировать выделение грибных элиситоров, которые индуцируют защитные реакции в несовместимой комбинации.

6. Изучение природы предполагаемого элиситора

Очевидно, что это вещество термостабильно, так как процедура его получения включает кипячение. Поэтому, возможно, что оно низкомолекулярно.

Действительно, удаление низкомолекулярных (менее 3 кД) компонентов лишаило диффузат активности (рис. 5). Однако взятая отдельно низкомолекулярная фракция тоже не стимулировала генерации O_2^- листьями или стимулировала существенно слабее, чем неразделенный диффузат. Если же фракции смешивали, элиситорная активность восстанавливалась полностью. Следовательно, она не была потеряна при разделении, а требовала одновременного присутствия и крупных, и мелких молекул.

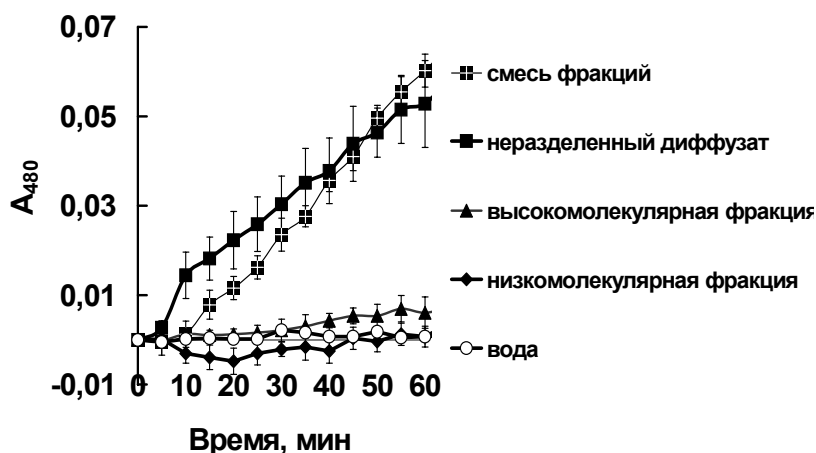


Рис. 5. Генерация O_2^- (по окислению экзогенного адреналина) в диффузатах незараженных листьев риса устойчивого сорта Zenith после нанесения на них воды или диффузата спор, проросших в 50 мкМ H_2O_2 , неразделенного или разделенного на фракции.

7. Оценка влияния эндогенных АФК прорастающих спор на их элиситорную активность

Ранее была обнаружена генерация АФК спорами *M. grisea* (Aver'yanov *et. al.*, 2007). Поэтому возможно, что споры выделяют элиситоры под действием собственных АФК. Для проверки споры проращивали не в H_2O_2 , а в воде или в растворах каталазы или СОД. Обнаружено, что диффузаты спор, проросших в растворах антиоксидантов, не стимулировали окисления адреналина листьями устойчивого сорта (рис. 6). Очевидно, это происходило из-за подавления генерации спорами O_2^- или H_2O_2 . Таким образом, прорастающие споры способны выделять элиситоры под действием не только экзогенных, но и собственных АФК.

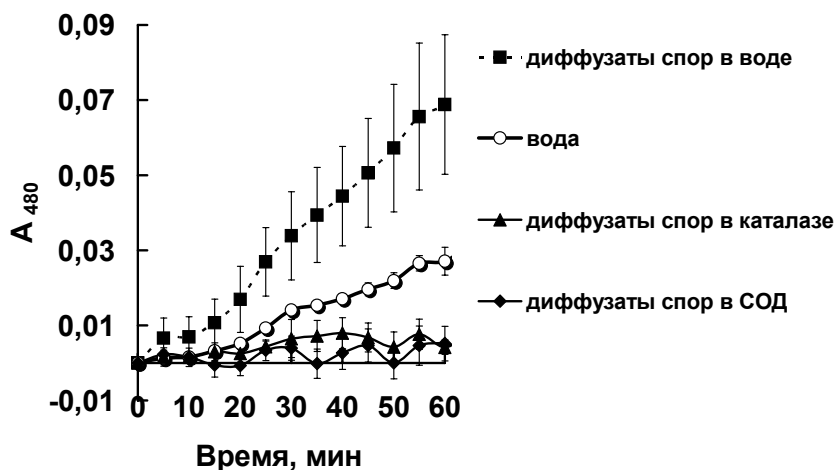


Рис. 6. Генерация O_2^- (по окислению экзогенного ад- реналина) в диффузатах не- зараженных листьев риса ус- тойчивого сорта Zenith, по- сле нанесения на них воды или диффузата спор, про- росших в воде, или растворе 20 мкг/мл каталазы, или рас- творе 20 мкг/мл СОД.

Известно, что эндогенные АФК ингибируют прорастание спор *M. grisea* в не- благоприятных условиях, в частности в слишком плотной или, напротив, в слишком разбавленной суспензии (Аверьянов, Лапикова, 1990). Мы получили аналогичные данные с тем же грибом (табл. 1) и с *C. cucumerinum*. В последнем случае в суспензи- ях экстремальных концентраций споры не только хуже прорастали и интенсивнее ге- нерировали радикал O_2^- (рис. 7), но и вызывали гораздо более слабые симптомы на листьях (табл.2), чем при оптимальной концентрации.

Таблица 1.

Прорастание спор *M. grisea* в суспензиях разной концентрации. Влияние 20 мкг/мл каталазы, добавленной в среду прорастания

| Концентрация спор (спор/мл) | Прорастание спор, % | |
|-----------------------------|---------------------|---------------|
| | без каталазы | с каталазой |
| 3×10^3 | 31 ± 3 | 76 ± 3 |
| 10^5 | 70 ± 4 | 77 ± 2 |
| 3×10^5 | 31 ± 2 | 69 ± 3 |

Возможно, что при неблагоприятных для прорастания концентрациях спор за- ражению препятствует не только их плохое развитие, но и выделяемые ими элисито- ры.

Итак, АФК могут стимулировать выход элисителей из спор патогена, что, ве- роятно, является еще одной защитной реакцией растения. Очевидно, что антиокси- данты, подавляющие любые АФК-зависимые защитные реакции, являются фактора- ми восприимчивости. Не исключено, что устойчивый хозяин подавляет антиоксидан-

ты паразита. Для проверки такой возможности изучали взаимодействие листьев риса с чужеродными антиоксидантами.

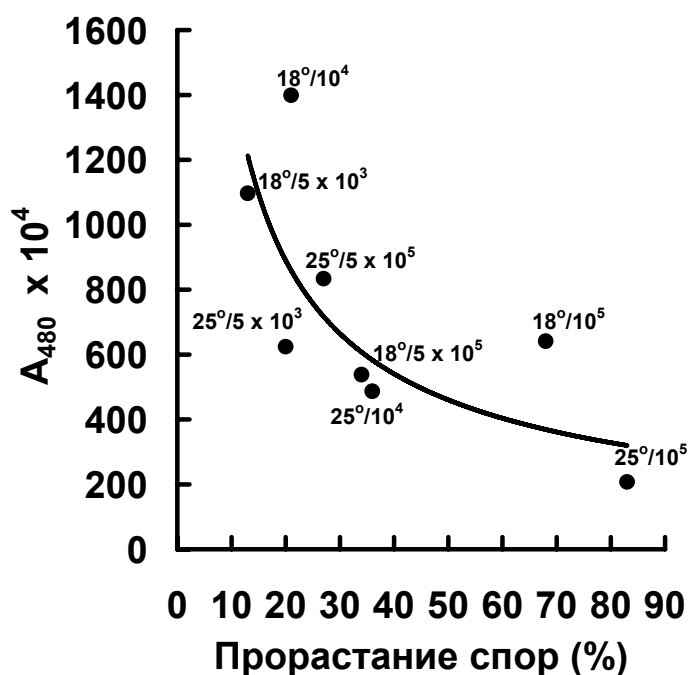


Рис. 7. Взаимосвязь между прорастанием спор *C. cucumerinum* и генерацией супероксидного радикала в их диффузатах. Температура (°C) / концентрация (спор/мл) указаны около каждой точки.

Таблица 2.

Зависимость визуальных симптомов оливковой пятнистости на листьях огурца от концентрации инокулюма *C. cucumerinum*

| Концентрация спор (спор/мл) | Частота симптомов (%) | | |
|-----------------------------|-----------------------|---------|--------|
| | указанного типа | | |
| | без симптомов | хлороз | некроз |
| 10 ⁴ | 48 ± 11 | 52 ± 11 | 0 ± 0 |
| 10 ⁵ | 3 ± 2 | 39 ± 6 | 58 ± 6 |
| 5 × 10 ⁵ | 46 ± 14 | 54 ± 14 | 0 ± 0 |

8. Фунгитоксичность диффузатов листьев риса и влияние СОД на это свойство в зависимости от ее контакта с листьями

Участие O₂⁻ в механизме фунгитоксичности листьев риса многократно подтверждено ее устранением при добавлении бычьей CuZn-СОД в диффузат. Если же фермент был добавлен в инокулюм (и контактировал с листом), то он не ослаблял фунгитоксичности диффузатов. Более того, вторая порция СОД, добавленная в диффузат, тоже была неэффективна, несмотря на удвоение концентрации. Эти данные, ранее полученные на отрезках листьев (Аверьянов, Лапикова, 1989), подтверждены на интактных растениях нескольких сортов с той же концентрацией фермента (рис. 8).

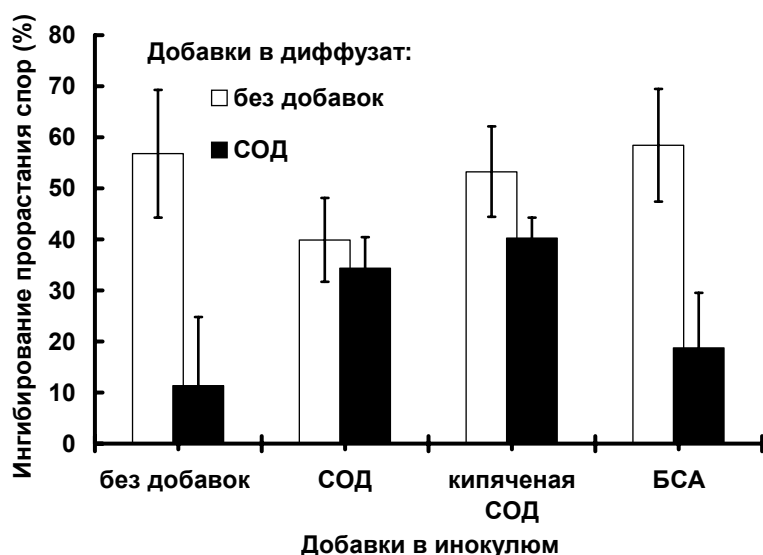


Рис. 8. Влияние 50 мкг/мл CuZn-СОД, добавленной в инокулюм и/или диффузат зараженных листьев риса устойчивого сорта, на токсичность их диффузатов для спор *M. grisea*. Для контроля в инокулюм добавляли 50 мкг/мл БСА или СОД, инактивированную кипячением.

Судя по анализу белка, концентрация СОД после контакта с листьями снижалась, но недостаточно для ослабления ее детоксицирующих свойств. Тем более, это не объясняет неэффективности второй порции. Очевидно, уменьшалась удельная активность СОД. Этого, однако, не удалось показать химическим методом (в системе ксантиноксидаза – NBT). Мы предполагаем, что СОД все же инактивировалась в диффузатах, но ревосстанавливалась в химической тест-системе. Антитоксическая активность СОД, которая проявлялась в диффузатах и терялась при контакте с листьями, была направлена именно против O_2^- , что подтверждается в искусственной O_2^- -генерирующей системе (табл.3).

Таблица 3.

Влияние СОД, проинкубированной на нейтральной поверхности или на незараженных листьях риса устойчивого сорта, на токсичность рибофлавин-метиониновой системы для спор *M. grisea*

| Добавки в систему | Ингибирование прорастания спор (%) | | |
|---|------------------------------------|---|---|
| Без добавок | 50 | ± | 8 |
| 50 мкг/мл CuZn-СОД, проинкубированная на пластике | 11 | ± | 6 |
| То же, проинкубированная на листьях | 51 | ± | 3 |

Чтобы проверить, характерно ли обнаруженное явление для других супероксиддисмутаз, помимо CuZn-СОД испытали Fe-СОД и Mn-СОД из *E.coli*. Бактериальные СОД, добавленные в инокулюм, не теряли своих детоксицирующих свойств. Но они были неэффективны в диффузате листа, контактировавшего с CuZn-СОД.

Низкомолекулярные антиоксиданты (тайрон, маннит и диметилтиомочевина), испытанные по той же схеме, не теряли защитных свойств.

По-видимому, CuZn-СОД (но не другие СОД), соприкасаясь с листьями, индуцировала выход ингибитора, действующего и на нее, и на фермент, добавленный затем в диффузат. При этом Fe-СОД и Mn-СОД, но не низкомолекулярные антиоксиданты были чувствительны к этому ингибитору.

9. Свойства молекулы СОД, индуцирующие выход предполагаемого ингибитора

Мы попытались выяснить, какая часть молекулы CuZn-СОД индуцирует выход ингибитора. Установлено, что если на листья наносили бычий сывороточный альбумин, Fe-СОД или Mn-СОД в той же концентрации (рис. 8), то они не влияли на детоксицирующие свойства CuZn-СОД, добавленной затем в диффузат. Однако кипяченая CuZn-СОД и хлорид меди (в эквивалентной концентрации), но не цинка индуцировали потерю защитных свойств СОД (табл. 4). Следовательно, выход предполагаемого ингибитора был реакцией не на белок фермента, а на его активный центр, в частности, на ионы меди.

Таблица 4.

Влияние CuZn-СОД или солей металлов ее активного центра, добавленных в инокулюм, на способность СОД, добавленной в диффузат зараженных листьев риса устойчивого сорта, ослаблять его токсичность для спор *M. grisea*

| Добавки в инокулюм | Ингибирование прорастания спор (%) | | | | | |
|---|------------------------------------|-------|---|-----------|-------|---|
| | Добавки в диффузат | | | | | |
| | без добавок | | | CuZn-СОД | | |
| Без добавок | 55 | \pm | 7 | 18 | \pm | 6 |
| 50 мкг/мл CuZn-СОД | 45 | \pm | 5 | 47 | \pm | 8 |
| 3.2 мкМ CuCl ₂ | 65 | \pm | 9 | 54 | \pm | 6 |
| 3.2 мкМ ZnCl ₂ | 64 | \pm | 9 | 27 | \pm | 2 |
| 3.2 мкМ CuCl ₂ + 3.2 мкМ ZnCl ₂ | 52 | \pm | 9 | 38 | \pm | 3 |
| 3.2 мк М MnSO ₄ | 58 | \pm | 7 | 13 | \pm | 8 |

10. Изучение природы предполагаемого ингибитора

Известно, что каталаза (Chen *et al.*, 1993), а также некоторые другие Fe- и Cu-содержащие ферменты (Ruffer *et al.*, 1995; Чуб, 2007) ингибируются салициловой кислотой (СК). В листьях риса ее содержится в несколько раз больше, чем в других растениях (Yang Y. *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1997). Поэтому не исключено, что она может ингибировать и СОД.

Действительно, в диффузатах листьев, которые инокулировали без СОД, экзогенная СК (10 мкМ) значительно ослабляла защитные свойства фермента, добавленного в диффузат (рис.9). При этом СК в отдельности не влияла на токсичность диффузата. Так же это вещество действовало на СОД в рибофлавин-метиониновой системе.

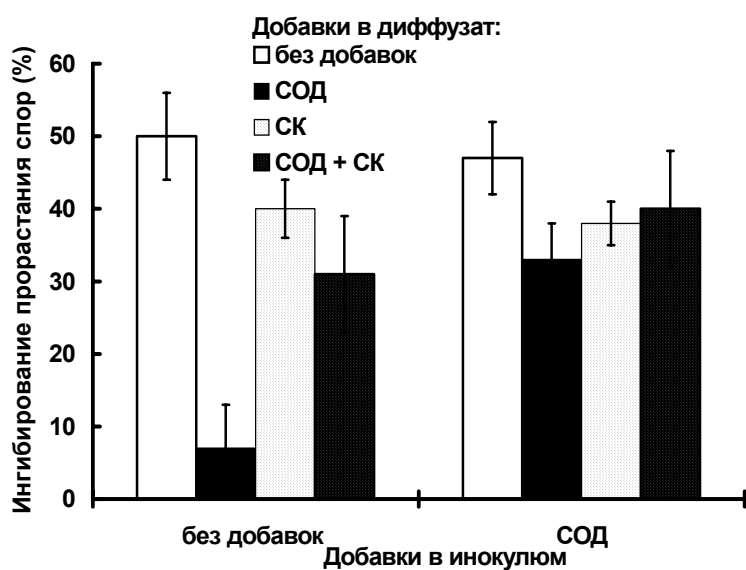


Рис. 9. Влияние CuZn-СОД, добавленной в инокулюм и/или диффузат зараженных листьев риса устойчивого сорта, на токсичность диффузата для спор *M. grisea*. Эффект 10 мкМ салициловой кислоты.

Следует отметить, что химические методы не выявили инактивации СОД салициловой кислотой, как и диффузатами листьев. Значит, СК и искомым ингибитор вели себя сходно.

Косвенное подтверждение участия СК в ингибировании фермента дают опыты, выполненные по той же схеме, но на каллусах риса. Известно, что клеточные культуры риса содержат СК на несколько порядков меньше, чем его листья (Chen *et al.*, 1997). Возможно, поэтому мы не обнаружили такой четкой потери защитных свойств СОД в диффузатах каллусов, но это происходило, если вместе с ней добавляли СК.

Таким образом, чужеродная СОД, по-видимому, вызывает выход ингибитора из листьев риса, и этим ингибитором может быть СК или родственное ей соединение. Возможно, что аналогичные изменения на листьях могут происходить и с антиокислительными ферментами патогена, снижая его жизнеспособность на хозяине. Обна-

руженный эффект, возможно, ограничивает применение СОД животного происхождения как инструмента исследования растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрены некоторые новые аспекты химических антагонистических взаимодействий патогенного гриба и растения на ранней стадии заражения (рис. 10). Чтобы воспроизвести естественные условия, опыты проводили на полностью интактных растениях без применения раневой инокуляции и смачивателей.

Установлено, что во взаимодействиях хозяина и патогена помимо их экзометаболитов участвует вода инфекционной капли. Она, благоприятствуя развитию патогена, одновременно может индуцировать болезнеустойчивость, предположительно, с участием АФК. Возможно, это связано с эндогенными элиситорами растений, освобождаемыми водой.

Увеличение продукции АФК в инфекционной капле как растением, так и патогеном, по-видимому, способно активировать выход элиситоров из его спор, что стимулирует образование АФК еще сильнее. Это, в свою очередь, приводит к подавлению развития паразита активными формами кислорода и другим защитным реакциям.

При любом участии АФК в противоиных реакциях растения антиокислители паразита, очевидно, являются факторами патогенности. Не исключено, что антагонизм со стороны растения выражается в ингибировании антиокислительных ферментов патогена, и это является одним из проявлений болезнеустойчивости.

Существенно, что вышеописанные процессы происходят на самой ранней стадии болезни и могут быть критичны для ее дальнейшего развития.

Таким образом, антагонизм растения и патогена в инфекционной капле, осуществляется, в частности, через взаимодействия АФК, элиситоров и антиокислителей, а также, возможно, и других веществ, влияющих на эти взаимодействия.

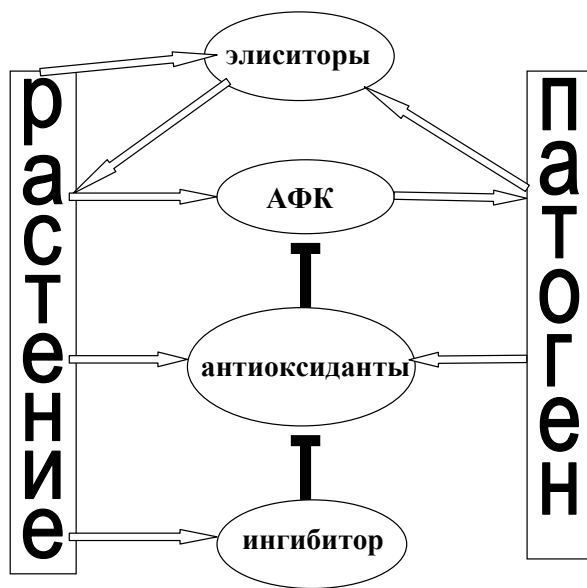


Рис.10. Проокислительные/антиокислительные взаимодействия растения и патогена в инфекционной капле.

ВЫВОДЫ

1. Однодневный поверхностный контакт листьев с небольшим объемом воды до заражения индуцирует локальную и системную устойчивость огурца к оливковой пятнистости и локальную устойчивость риса к пирикуляриозу. Это может быть адаптацией к условиям повышенного увлажнения, благоприятным для инфекции.
2. У риса этой реакции предшествует и является возможной ее причиной увеличение продукции O_2^- листьями. Вероятно, оно является следствием вымывания элиситоров из контактирующих с водой тканей растения.
3. Диффузат спор *M. grisea* стимулирует продукцию O_2^- и некротизацию листьев устойчивого сорта риса. Этой элиситорной активности нет, если споры прорастали в растворах СОД или каталазы. Нетоксичная концентрация H_2O_2 , напротив, стимулирует ее. В элиситорной активности диффузата спор участвуют как его высоко-, так и низкомолекулярные компоненты. Следовательно, собственные АФК прорастающих спор, а, возможно, и АФК хозяина способствуют выходу грибных элиситоров. Предполагается, что это один из механизмов несовместимости.

4. Чужеродная CuZn-СОД теряет детоксицирующие свойства на листьях риса или в диффузатах таких листьев, ранее контактировавших с ферментом. Предполагается, что растения выделяют ингибитор СОД и, возможно, других антиоксидательных ферментов патогена.
5. Салициловая кислота подавляет детоксицирующие свойства СОД в диффузатах листьев и каллусов риса. Не исключено, что она (или родственное соединение) является ингибитором СОД, выходящим из листьев. Индуктором его выхода могут быть ионы меди активного центра фермента.
6. Таким образом, антагонизм растения и патогена в инфекционной капле осуществляется, в частности, через взаимодействия АФК, элиситоров и антиоксидантов, а также, возможно, и других веществ, влияющих на эти взаимодействия.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Aver'yanov A.A., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Romanova T.S., Gaivoron-skaya L.M., Abramova O.S., Kuznetsov V.V., Baker J.C.** (2006) Prooxidant/antioxidant early interactions of rice plant with blast fungus. In: *XV FESPB Congress. July 17-21. Lyon-France, Lyon*, p. 141.
2. **Aver'yanov A.A., Lapikova V.P., Pasechnik T.D., Romanova T.S., Gaivoron-skaya L.M., Abramova O.S., Baker J.C.** (2006) ROS and antioxidants in the infection droplet as related to rice blast resistance. In: *Non-specific innate and acquired plant resistance. August 31- September 3, 2006. Budapest, Hungary, Budapest*, p. 17.
3. **Aver'yanov A.A., Romanova T.S., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Baker J.C.** (2007) Water droplets on rice leaves induce resistance to blast. In: *15th International Reinhardsbrunn Symposium «Modern Fungicides and Antifungal Compounds. May 06-10, 2007. Friedrichroda – Germany»*, Friedrichroda, p. 122.
4. **Aver'yanov A.A., Romanova T.S., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Gaivoron-skaya L.M., Baker C.J.** (2007) Alien enzymatic antioxidants can lose their protective potential in contact with rice leaves. In: *International Symposium “ROS in Plants. Signalling & Metabolism, Oxidative stress, Antioxidants”. September 12-14, 2007, Ghent, Belgium, Ghent*, p.57.
5. **Aver'yanov A.A., Romanova T.S., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Baker C.J.** (2008) How could water droplets on rice leaves reduce severity of rice blast infec-

- tion? In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V.*, Dehne H.W., Deising H., Gisi U., Kuck K.H., Russell P.E., Lyr H. (eds.) Alton, UK: BCPC, p. 52.
6. **Aver'yanov A.A., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Romanova T.S., Gaivoron-skaya L.M., Abramova O.S., Kuznetsov V.V., Baker C.J.** (2008) Early pro- / anti-oxidative interplay between host and parasite. In: *9th International Congress of Plant Pathology (ICPP 2008). August 24-29, 2008. Torino, Italy*, Pisa: EDIZIONI ETS, S2.211-212.
 7. **Романова Т.С., Аверьянов А.А., Пасечник Т.Д., Лапикова В.П., Бейкер К.Дж.** (2009) Устойчивость риса к пирикулярриозу, вызванная поверхностным увлажнением листьев перед заражением. *Физиология растений*, **56**, 431–436.
 8. **Romanova T.S., Aver'yanov A.A., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Baker C.J.** (2009) Contact of blast spores to ROS and rice leaves to water may elicit ROS-dependent plant defense responses. In: *A SFRR Plant Oxygen Group Meeting on Reactive Oxygen and Nitrogen Species «Plant ROS 2009»*. July 8-10, 2009. Finland, Helsinki, p. 114.
 9. **Aver'yanov A.A., Romanova T.S., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Abramova O.S., Gaivoron-skaya L.M., Baker C.J.** (2009) Pro- and antioxidant activating fungal spores as related to plant disease resistance. In: *A SFRR Plant Oxygen Group Meeting on Reactive Oxygen and Nitrogen Species «Plant ROS 2009»*. July 8-10, 2009. Finland, Helsinki, p. 97.
 10. **Захаренкова Т.С., Аверьянов А.А., Пасечник Т.Д., Лапикова В.П., Бейкер К.Дж.** (2010) Выделение элиситоров спорами возбудителя пирикулярриоза риса под влиянием активных форм кислорода. *Физиология растений*, **57**, 615-619.
 11. **Захаренкова Т.С., Аверьянов А.А., Пасечник Т.Д., Лапикова В.П., Бейкер К.Дж.** (2010) Капли влаги на листьях как фактор устойчивости к инфекциям. В сб.: *Всероссийский симпозиум «РАСТЕНИЕ И СТРЕСС»*. 9-12 ноября, Москва, Москва, с 155-156.