

ЖУК І. В.^{1✉}, ДМИТРИЄВ О. П.¹, ШИЛІНА Ю. В.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

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ У ЯКОСТІ БІОТИЧНИХ ЕЛІСІТОРІВ ЗА ЗМІНАМИ ПУЛУ ЕНДОГЕННОГО ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ

Мета. Метою досліджень було проаналізувати та порівняти в польових умовах вплив щавлевої, ферулової та коевої кислот на стійкість пшениці озимої до *Septoria tritici Rob et Desm.*, оцінити їх ефективність, у тому числі й за пулом пероксиду водню. **Методи.** Вміст пероксиду водню вимірювали в оброблених елісатором та інфікованих *S. tritici* сорту Оберіг миронівський протягом вегетаційного періоду. Проведено також морфометричні виміри рослин, оцінку ступеня розвитку хвороби та аналіз структури врожаю. **Результати.** Доведено, що дія досліджених органічних кислот індукуює різний рівень ендогенного пероксиду водню у листках пшениці, інфікованих *S. tritici*. Встановлено, що серед випробуваних органічних кислот у якості біотичних елісаторів у сорту пшениці озимої Оберіг миронівський за обробки щавлевою кислотою у період візуальних проявів захворювання септоріозом листя вміст ендогенного пероксиду водню був найнижчим, а коевою кислотою – найвищим. **Висновки.** Отримані дані свідчать про те, що пероксид водню є чутливим біохімічним критерієм.

Ключові слова: біотичні елісатори, пероксид водню, індукована стійкість, *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici Rob et Desm.*

Одним із засобів органічного землеробства для уникнення накопичення надлишкової кількості пестицидів є використання біотичних елісаторів. Стимуляція неспецифічного імунітету дозволяє знизити ймовірність епіфітотій та втрат урожаю сільськогосподарських рослин. Тривалі пошуки ефективних речовин та їх комбінацій призвели до здійснення активації неспецифічного імунітету метаболічними шляхами, які залежать від хімічної природи біотичного елісатора, а не лише від перебігу захисних реакцій рослин. Такий підхід вимагає оцінки ефективності біотичних елісаторів за показником,

що враховував би біохімічні зміни до моменту візуальних проявів симптомів захворювання. Пероксид водню є сигнальною молекулою, що задіяна в фотосинтетичному статусі, рухах продохів та системній набутій стійкості рослин до патогенів.

Тому метою наших досліджень було порівняння та оцінка органічних кислот, що мають потенціал біотичних елісаторів, за пулом ендогенного пероксиду водню як біохімічного показника ступеня активації сигнальних систем рослин.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був сорт пшениці озимої м'якої *Triticum aestivum* L. Оберіг Миронівський, наданий оригіном – Миронівським інститутом пшениці імені В. М. Ремесла НААН України.

У польовому досліді рослини пшениці обприскували 0,1 мМ водним розчином щавлевої, ферулової та коевої кислот у фазі виходу в трубку; на третю добу після цього проводили інюкуляцію збудником септоріозу *S. tritici* у концентрації 10⁶ спор/мл із застосуванням прилипача.

У якості маркера індукованої стійкості визначали в прапорцевих листках вміст пероксиду водню за реакцією з сульфатом титану [1]. Відбір зразків проводили через добу після зараження і в подальшому протягом періоду колосіння-цвітіння та дозрівання зерна. Оцінку ураження та ступеня розвитку хвороби проводили у фазу молочно-воскової стиглості зерна, використовуючи 9-бальну шкалу Саарі та Прескотта [2]. У цей же період визначали морфометричні параметри – висоту рослин, довжину колоса та прапорцевого листка. Після дозрівання зерна проводили аналіз структури врожаю. Повторність дослідів триразова. Результати обробляли статистично з використанням ANOVA.

Результати та обговорення

З'ясовано, що у сорту пшениці озимої Оберіг миронівський серед випробуваних у якості біотичних еліситорів органічних кислот обробка щавлевою кислотою у період візуальних проявів захворювання септоріозом найбільше знижувала вміст ендogenous пероксиду водню. При цьому встановлено, що найвищим пул пероксиду водню був за впливу коєвою кислотою на рослини (рис. 1, 2). Динаміка пулу пероксиду водню протягом вегетаційного періоду за дії коєвої кислоти показала, що у неінфікованих збудником септоріозу листків рослин пшениці цей біотичний еліситор до колосіння-цвітіння не спричиняє зростання вмісту пероксиду водню (рис. 2). На відміну від цього, у прапорцевих листках рослин, інфікованих *S. tritici*, після об-

робки коєвою кислотою зростання пероксиду водню було вже протягом латентного періоду розвитку інфекції (рис. 2). Встановлено, що з переходом до некротрофного розвитку патогена за впливу коєвої кислоти вміст пероксиду в листках наближається до контролю та різко зростає наприкінці вегетаційного періоду (рис. 2).

Пероксид водню – сигнальна молекула, що транспортується через аквапоринові канали плазматичної мембрани [3]. Встановлено, що у взаємодії патоген-рослина пероксид водню задіяний як у прямому знешкодженні патогенів, так і у процесах посилення клітинної стінки, синтезі фітоалексинів, забезпеченні у місці інфекції індукованої клітинної загибелі, експресії генів захисту та сигналіngu неспецифічної набутої стійкості [4, 5].

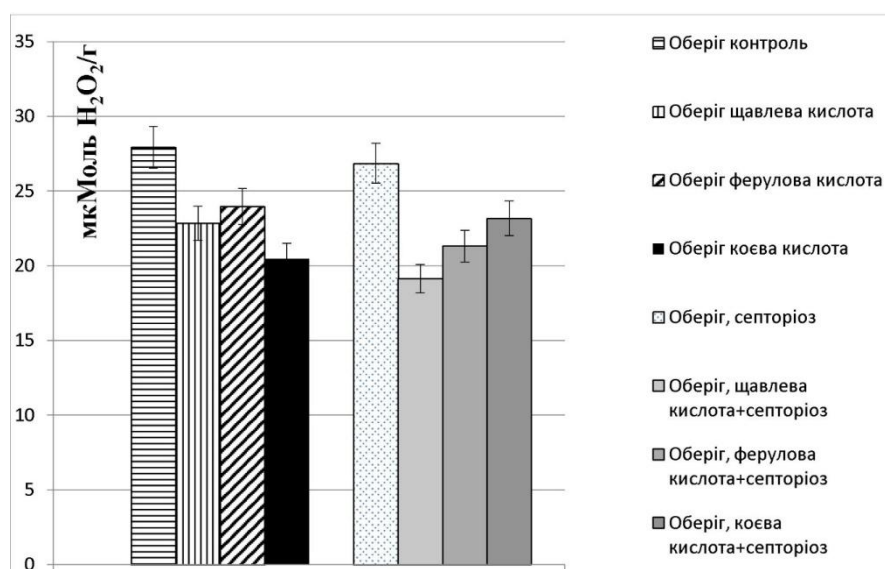


Рис. 1. Вміст ендogenous пероксиду у листках пшениці сорту Оберіг миронівський за дії біотичних еліситорів щавлевої, ферулової, коєвої кислот та інфікування збудником септоріозу листа *Septoria tritici*.

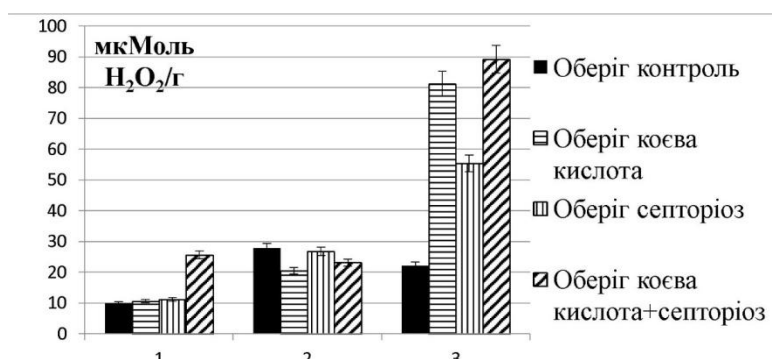


Рис. 2. Вміст ендogenous пероксиду водню за дії біотичного еліситору коєвої кислоти та інфікування збудником септоріозу листа в листках пшениці озимої сорту Оберіг миронівський. 1 – фаза виходу в трубку, 2 – колосіння-цвітіння, 3 – молочно-воскової стиглості.

Відомо, що позаклітинний H_2O_2 є тригером для входу іонів кальцію у клітину, що призводить до системної трансмісії сигналів між клітинами та активації стійкості до патогенів. Ідентифіковано як поверхневий рецептор до позаклітинного пероксиду водню білок НРСА1, який належить до родини LRR кіназ. Тіольні групи залишків цистеїну є мішенню для окислення H_2O_2 [6]. Також пероксид водню залучений у регуляції продигового апарату рослин разом із фітогормонами, а саме через продиhi з краплинною вологою проникають спори грибних фітопатогенів. Таким чином, у якості біохімічного показника під час перебігу системної неспецифічної відповіді рослин на проникнення та розвиток грибного патогена всередині рослини вміст ендogenous пероксиду водню є інформативним та чутливим критерієм.

Нашими попередніми дослідженнями доведено, що обробка рослин пшениці в польових умовах органічними кислотами в якості біотичних елісаторів впливала на динаміку активності антиоксидантних ферментів, що утилізують пероксид водню та регулюють його ендogenous пул [7–11]. Нами також встановлено, що сумісна обробка елісатором із донором оксиду азоту, який у певних концентраціях може виступати антагоністом пероксиду водню та активує інші сигнальні шляхи, також впливає на стимуляцію неспецифічного захисту рослин до фітопатогенів у польових умовах [8, 10, 11]. Відомо, що між функціональним станом хлоропластів та антиоксидантним статусом фотосинтезуючих клітин рослин існує взаємовплив, отже, і зменшення площі ураженої поверхні листків, і стабілізація рівня ендogenous пероксиду водню свідчать про ефективність елісатора: запобігання поширенню інфекції по рослині та зниження втрат врожайності. Виявлено, що відбувався вплив на спорутворення грибного патогена, а отже, індукування неспецифічної стійкості шляхом обробки біотичними елісаторами може вплинути на перехід до некротрофної стадії цього грибного захворювання.

Відомо, що у збудника септоріозу інфекційний цикл залежить від росту гіф всередині рослинної тканини і поділений на латентний та некротрофний періоди. Під час проникнення спор через продиhi гіфи гриба проростають протягом 12–24 год, колонізуючи мезофіл. Упродовж 9–15 діб формується мережа у внутрішньоклітинному просторі рослинної тканини. У цей період візуально симптоми захворювання

не проявляються, тривалість залежить від комбінації генотипу пшениці та збудника, у польових умовах також від погоди. На 10–12 день розвитку інфекції формуються пікніди, відбувається перехід до некротрофної стадії. Руйнування тканин господаря є наслідком програмованої загибелі клітин та значного збільшення у розмірах гіф гриба. Генотипом *S. tritici* містить ферменти, що розщеплюють клітинну стінку рослин та експресуються на цьому етапі. Припускають, що це запускає реакції захисної системи рослин. Пікніди зовні нагадують темні плями на некротизованій поверхні листків, і на цьому етапі можна візуально оцінити за шкалою Саарі-Прескотта ступінь розвитку ураження [12].

Щавлева кислота є хелатуючим агентом для іонів кальцію та однією з найсильніших кислот, наявних у рослинному організмі. Вплив щавлевої кислоти як індуктора неспецифічної стійкості рослин до грибних патогенів може бути зумовлений зміною рН та наслідком цього для клітинної стінки, взаємодією з іонами металів, що є кофакторами антиоксидантних ферментів. Також відомо, що потік іонів кальцію в клітини пов'язаний із сигналігом пероксиду водню [13].

Нами з'ясовано, що у сорту пшениці озимої Оберіг миронівський серед досліджених у якості біотичних елісаторів органічних кислот щавлева кислота на етапі прояву візуальних ознак септоріозу листя індукувала найнижчий рівень ендogenous пероксиду водню, а найбільш наближеним до контролю був пул за дії коєвої кислоти (рис. 1). Встановлено, що за впливу ферулової кислоти та біотичного стресу вміст ендogenous пероксиду водню у порівнянні з ефектами двох інших досліджених органічних кислот був середнім (рис. 1). Відомо, що ферулова кислота є сильним антиоксидантом та компонентом клітинної стінки. Ймовірно, її вплив на вміст ендogenous пероксиду водню також міг бути прямим та опосередкованим через регуляцію активності пероксидаз, що беруть участь у синтезі клітинної стінки.

Окремо проаналізовано зміни ендogenous пероксиду водню у прапорцевих листках пшениці озимої за дії коєвої кислоти та інфікування збудником септоріозу листя (рис. 2).

Встановлено, що у фазу виходу в трубку на початку розвитку інфекції у листках сорту пшениці озимої Оберіг миронівський значно зростав вміст ендogenous пероксиду водню у варіанті з обробкою коєвою кислотою та іноку-

ляцією спорами *S. tritici* (рівень більш ніж удвічі вищий від контрольного). У період колосіння-цвітіння відмінності між варіантами не були такими значними. Наприкінці вегетації, у період молочно-воскової стиглості зерна, помічено зростання пулу ендogenous пероксиду водню у варіантах, оброблених коєвою кислотою. Відомо, що коєва кислота є інгібітором тирозинази, а отже, очевидно, перешкоджає розвитку грибного фітопатогена, гальмує утворення темнозбарвленого пігменту спор. Коєва кислота здатна утворювати стабільні комплекси з ацетатами металів і таким чином впливати на іонний баланс у рослинних клітинах. Нашими попередніми дослідженнями встановлена корекція впливу біотичних елісаторів за використання з донором оксиду азоту [8–11].

Відомо, що генерація ендogenous пероксиду водню пов'язана у тому числі й із функціонуванням фотосинтетичного апарату рослинних клітин, а регуляція продигової щілини – одним із процесів, що залежить від сигналіngu H_2O_2 [14–16]. Встановлено, що везикулярний транспорт відіграє значну роль у рослинному імунитеті, а активні форми кисню, найбільш довгоживучою серед яких є пероксид водню, ма-

ють певне значення і у міжклітинному сигналіngu [17, 18].

З'ясовано, що ураження листків під час застосування біотичних елісаторів зменшувалося на 1–2 бали за шкалою Саарі-Прескотта. Встановлено, що ферулова кислота найбільше стимулювала ріст рослин та збільшення прапорцевих листків, однак усі досліджені у якості біотичних елісаторів органічні кислоти підвищували врожайність за рахунок збільшення числа зерен у колосі.

Висновки

1. Встановлено, що серед випробуваних органічних кислот у якості біотичних елісаторів у сорту пшениці озимої Оберіг миронівський за обробки щавлевою кислотою у період візуальних проявів захворювання септоріозом листя вміст ендogenous пероксиду водню був найнижчим, а коєвою кислотою – найвищим.

2. Перспективними є композиції біотичних елісаторів, які містять щавлеву кислоту для індукції неспецифічної стійкості до фітопатогенів, що завдають найбільшої шкодочинної дії на ранніх етапах розвитку, і коєву кислоту – для випадків, коли важливими є пролонгована дія та інгібування утворення спор.

References

1. Chen L.-M., Kao Ch.-H. Effect of excess copper on rice leaves: evidence involvement of lipid peroxidation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1999. Vol. 40. P. 283–287.
2. Babayants O.V., Babayants L.T. Basis of selection and methodology of wheat tolerance estimation to diseases agents. Odessa, 2014. 401 p. [in Russian] / Бабаянц О.В., Бабаянц Л.Т. Бабаянц О.В., Бабаянц Л.Т. Основы селекции и методологии оценки устойчивости пшеницы к возбудителям болезней. Одесса, 2014. 401 с.
3. Zhang L. et al. Plant aquaporins in infection by and immunity against pathogens – a critical review. *Frontiers in Plant Science*, 2019. Vol. 1. doi: 10.3389/fpls.2019.00632.
4. Li Jin-Ge et al. Brassinosteroid and hydrogen peroxide interdependently induce stomatal opening by promoting guard cell starch degradation. *Plant Cell*. 2020. Vol. 32 (2). P. 295–318. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00587>.
5. Huang H. et al. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses, *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00800.
6. Wu et al. Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature*. 2020. Vol. 578. P. 577–581. doi: 10.1038/s41586-020-2032-3.
7. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M. Жук І.В., Дмитрієв О.П., Лісова Г.М. The specifics of elicitor effect on *Triticum aestivum* L. macromorphogenesis under simultaneous lesion by *Septoria tritici* and *Puccinia recondita*. *Modern Phytomorphology*. 2016. Vol. 10. P. 117–123. [In Ukrainian] / Специфіка дії елісаторів and на макроморфогенез у *Triticum aestivum* за умов одночасного ураження *Septoria tritici* та *Puccinia recondite*. *Modern Phytomorphology*. 2016. Т. 10. С. 117–123. doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.155369>.
8. 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. [in Ukrainian] / Вплив щавлевої кислоти та нітропрусиду натрію на продуктивність і стійкість озимої пшениці до збудників септоріозу та бурі іржі. *Вісник Харківського національного університету. Серія Біологія*. Т. 2, 41. С. 68–76.
9. 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. [in Ukrainian] / Участь ферулової кислоти в індукванні стійкості рослин озимої пшениці проти збудника септоріозу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 190–193.
10. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M., Kucherova L.O. The combination of NO donor and ferulic acid effect on the elicitation of *Triticum aestivum* tolerance against *Septoria tritici*. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2018. Vol. 23. P. 240–245. [in Ukrainian] / Жук І.В., Дмитрієв О.П., Лісова Г.М., Кучерова Л.О. Комбінована дія донора NO та феру-

- лової кислоти для індукування стійкості *Triticum aestivum* проти *Septoria tritici*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 23. С. 240–245. doi: <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v22.955>.
11. Zhuk I.V., Dmitriev A.P., Lysova G.M., Kucherova L.O. The influence of kojic acid and NO donor on *Triticum aestivum* L. under biotic stress. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2019. Vol. 25. P. 225–230. [in Ukrainian] / Вплив коєвої кислоти та донора NO на *Triticum aestivum* L. за умов біотичного стресу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 225–230. doi: <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v25.1166>.
 12. Precigout P.-A., Claessen D., Makowski D., Corinne R. Ecology and epidemiology. does the latent period of leaf fungal pathogens reflect their trophic type? A Meta-Analysis of biotrophs, hemibiotrophs, and necrotrophs. *Phytopathology*. 2020. Vol. 110. P. 345–361. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-19-0144-R>.
 13. Foyer C.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*. 2011. Vol. 155. P. 2–18. doi: [10.1104/pp.110.167569](https://doi.org/10.1104/pp.110.167569).
 14. Chen Z., Gallie D.R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*. 2004. Vol. 16. P. 1143–1162.
 15. Smirnoff N., Arnaud D. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*. 2019. Vol. 221. P. 1197–1214. doi: [10.1111/nph.15488](https://doi.org/10.1111/nph.15488).
 16. Soltis N.E., Kliebenstein D.J. Natural variation of plant metabolism: genetic mechanisms, interpretive caveats, and evolutionary and mechanistic insights. *Plant Physiology*. 2015. Vol. 169. P. 1456–146. doi: [10.1104/pp.15.01108](https://doi.org/10.1104/pp.15.01108).
 17. Yun H.S., Kwon C. Vesicle trafficking in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 2017. Vol. 40. P. 34–42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.001>.
 18. Schmidt R., Kunkowska A.B., Schippers J.H.M. Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves. *Plant Physiol*. 2016. 172 (4). P. 2098–2106. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.16.00426>.

ZHUK I.V.¹, DMITRIEV A.P.¹, SHYLINA Ju.V.¹, LYSOVA G.M.², KUCHEROVA L.O.²

¹ *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Natl. Acad. Sci., Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: ivzhukvi@gmail.com*

² *Institute of Plant Protection of Natl. Acad. Agrar. Sci., Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33, e-mail: mail_gl@ukr.net*

THE ESTIMATION OF ORGANIC ACIDS EFFECTIVENESS AS BIOTIC ELICITORS VIA CHANGES OF ENDOGENOUS PEROXID CONTENT

Aim. The usage of biotic elicitors for elicitation of defense responses may induce plant disease resistance and prevent increased environmental pollution by pesticides. Hydrogen peroxide is a well-known signal molecule for photosynthetic status and for stomatal movements, and systemic acquired resistance to pathogens in plants proposed to be dependent on H₂O₂. The aim of research was to analyze in field trials the effect of oxalic, ferulic and kojic acid on H₂O₂ content and winter wheat resistance against *Septoria tritici*. **Methods.** Content of endogenous H₂O₂ was measured in elicitor treated and inoculated by *S. tritici* wheat plants (cv. Oberig) during different ontogenesis phases. The extent of disease development, morphometric parameters and yield structure were analyzed. **Results.** It is shown that the lowest level of hydrogen peroxide in leaves at the necrotrophic stage of pathogen infection was after oxalic acid treatment, and the highest – after kojic acid influence. **Conclusions.** The data obtained suggest that elicitors induced defense responses in winter wheat against *S. tritici* and hydrogen peroxide content is an important and valuable parameter.

Keywords: biotic elicitors, hydrogen peroxide, induced resistance, *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici* Rob et Desm.