

ХАБЛАК С. Г.^{1✉}, СПИЧАК В. М.¹, АБДУЛЛАЄВА Я. А.²

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2А, ORCID: 0000-0003-4027-317X, 0009-0001-3734-5606

² ТОВ «РОЗКОМ»,

Україна, смт. Коцюбинське

✉ sergeyhab211981@gmail.com, 0664426608

ЗАХИСТ СОНЯШНИКУ ВІД ПАРАЗИТА ВОВЧКА (*OROBANCHE CUMANA* WALLR.) ШЛЯХОМ СТИМУЛЮВАННЯ ІМУНІТЕТУ

Мета. Вивчення можливості стимулювання імунітету соняшнику для захисту від паразита вовчка індукторами системної стійкості рослин хімічного і біологічного походження, що викликають утворення активних форм кисню і запускають захисні механізми рослин через сигнальний шлях саліцилової кислоти (SA). **Методи.** Оцінку на стійкість соняшнику до вовчка, обробленого препаратами, що індукують імунітет рослин, проводили у вегетаційному досліді у ґрунтовій культурі за модифікованою методикою. **Результати.** Обприскування рослин соняшнику гібрида Р64LE99, що штучно заражені паразитом вовчком, індукторами системної стійкості хімічного (препарат із саліцилової кислоти) і біологічного походження (препарат із трутовика справжнього) забезпечило контроль патогену на рівні 80 %. Препарати із саліцилової кислоти і трутовика справжнього знижують зараження соняшника вовчком шляхом індукції набутої системної резистентності, що характеризується запуском захисних реакцій рослин. **Висновки.** Обробка рослин препаратами природного і синтетичного походження, що стимулюють імунітет рослин, як окремо, так і у комбінації з класичними фунгіцидами, можуть бути перспективною стратегією захисту соняшника від паразита вовчка із якіснішим збереженням навколишнього середовища і підставою для створення четвертого покоління засобів захисту.

Ключові слова: *Orobanche cumana* Wallr., раса, соняшник, гібрид, коренева система.

Процес інфікування клітин і виникнення зворотних імунних відповідей у рослин при зараженні патогенами має схожі риси й однотипний перебіг захисних відповідей. У взаємодії між паразитом вовчком та соняшником можуть діяти механізми стійкості, які зупиняють пато-

гену у корі кореня, в ентодермі або після досягнення центрального циліндра. Клітинна стінка є першою перешкодою, яку мають подолати патогени. Клітинні оболонки клітин, що ростуть, мають «первинну» будову. До складу клітинних стінок входять целюлоза і речовини матриксу (геміцелюлози, пектини та білки). У клітинах, що вже сформувалися, клітинні стінки посилені лігніном, суберином, калозою [1].

Захисні реакції соняшника від вовчка складаються з укріплення клітинної стінки через осадження на ній лігніну, суберину, накопичення калози, захисних білків, антимікробних сполук та перехресного зшивання білків, а також реакції гіперчутливості (HR), які перешкоджають проникненню паразита та зв'язку з судиновою системою господаря. Полімери лігніну, суберину і калози зміцнюють структуру клітинної стінки шляхом збільшення її жорсткості у місці інфекції, а реакція гіперчутливості (HR) призводить до локалізованої загибелі рослинної клітини, щоб обмежити проникнення паразита [2].

Біосинтез і відкладення лігніну або лігніноподібних фенольних полімерів, суберину і калози у клітинних стінках та програмована смерть клітин у місцях зараження можуть бути швидко індуковані хімічним і біологічним шляхом через сигнальний шлях саліцилової кислоти (SA) у відповідь на біотичні та абіотичні стреси, а також на структурні пошкодження [3].

Лігніфікація, як правило, починається під час формування вторинної клітинної стінки. Зазвичай клітини рослини позбавлені лігніну під час вегетативної стадії. Як тільки рослина починає цвісти, відбувається вироблення лігніну. Клітини паренхіми починають зміцнювати свої вторинні клітинні стінки, виробляючи лігнін. Тому паренхіма перетворюється на склеренхіму, тканину, призначену для механічної під-

© ХАБЛАК С. Г., СПИЧАК В. М., АБДУЛЛАЄВА Я. А.

тримки. Біотичний та/або абіотичний стрес також може спричинити лігніфікацію в стінках клітин, які зазвичай не лігніфікуються за умов відсутності стресу [4].

Виникнення системної набутої резистентності (SAR), що викликають захисні реакції у рослин від патогенів, залежить від сигнальних молекул саліцилової кислоти (SA) і жасмонової кислоти (JA) / етилену (ET). У рослин при зараженні патогенами сигнальний шлях саліцилової кислоти (SA) індукується для успішної стійкості проти біотрофів (бактерії, віруси, нематоди і біотрофні гриби), тоді як запуск сигнальних шляхів жасмонової кислоти (JA) / етилену (ET) зазвичай призводить до успішного захисту від некротрофів і комах. Жасмонова кислота і етилен синтезуються у разі механічного ушкодження клітини і пошкодження цитоплазматичної мембрани [5].

Захист рослин сояшнику від паразита вовчка може бути активований біологічними і хімічними речовинами (елісаторами або індукторами системної стійкості рослин), які індукують роботу сигнальних систем активних форм кисню (АФК) і запускають праймінг захисних реакцій через сигнальний шлях саліцилової кислоти (SA) та викликають системну стійкість проти патогенів для лікування вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб і контролю паразитичних рослин, які важко контролюються традиційними хімічними методами.

З'ясування даних питань і екстраполяція цих моментів на інші культури дозволить поглибити теорію імунітету рослин до патогенів, краще зрозуміти залучення клітинної стінки у захисних реакціях клітини проти патогенних організмів, вивчити механізми стійкості, пов'язаних із клітиною, і зрозуміти, чому ці процеси не спрацьовують при зустрічі з деякими хвороботворними мікроорганізмами та вірусами, що має фундаментальне значення для селекції та захисту рослин для створення стійких сортів і гібридів та засобів захисту четвертого покоління, які індукують імунітет рослин як окремо, так і у комбінаціях з класичними фунгіцидами, та не дозволяють швидко виникнути резистентності до системним препаратам.

Метою наших досліджень було вивчення можливості стимулювання імунітету сояшнику для захисту від паразита вовчка індукторами системної стійкості рослин хімічного і біологічного походження, що викликають утворення АФК і запускають захисні механізми рослин

через сигнальний шлях саліцилової кислоти (SA).

Матеріали і методи

Об'єктом для досліджень у вегетаційному досліді було насіння вовчка. Зразки насіння паразита були зібрані на окремих, найбільш заражених полях сояшнику на території Лісо-степу і Поліссі. Для дослідження процесу зараження вовчком сояшника використовували гібрид Р64LE99 селекції компанії Піонер, який має стійкість до рас паразиту А-Е+система 2.

Оцінку на ступінь зараження сояшнику вовчком проводили у ґрунтовій культурі за модифікованою методикою В. Ф. Кукіна [6]. Для вивчення стимулювання імунітету сояшника з метою захисту від паразита вовчка як індуктора системної стійкості рослин хімічного походження використовували саліцилову кислоту, а біологічного походження застосовували витяжку із некротрофного гриба трутовика справжнього (лат. *Fomes fomentarius* (L.) Fr.).

Як основа до препарату біологічного походження використовували некротрофний гриб *F. fomentarius*, який називають трутовиком, що є звичайним деревним грибом, цінним багатьма цікавими фітохімічними речовинами та унікальною пористою структурою. *F. fomentarius* є чудовим джерелом потужних антиоксидантів, таких як ортохінон 3,4-дигідро бензальдегід (3,4-DHBA), похідної галової кислоти, пурпурогалін, полімерних глюканів і хітину.

Виробництво препарату із трутовика проводили відповідно до протоколу, описаного в літературі [7]. Зразки плодових тіл трутовика були зібрані у лісах поблизу міста Києва. Свіжозібрані зразки сушили при 40°C до досягнення постійної ваги, що зазвичай займало близько десяти днів, а потім зберігали в сухому місці до подальшого використання.

Рослини сояшника обробляли препаратами хімічного і біологічного походження 2 рази у фазах 1 і 2 пар справжніх листків і порівнювали ступінь зараження вовчком коріння у порівнянні з контролем (не обробленими рослинами) у фазі 3 пар справжніх листків.

Стійкість у сояшнику можна охарактеризувати на етапі до прикріплення до хазяїна, на стадії прикріплення до утворення гаусторія (сумісні/несумісні) і на стадії горбиків після формування гаусторія (кількісне визначення кількості горбків і некроз горбків). Поява горбиків визначалася як період після утворення

гаусторія і встановлення судинних зв'язків. Кількість горбиків на коренях соняшнику дозволяє на ранній стадії в постгаусторіальний період відрізнити сприйнятливий й стійкий генотипи соняшнику.

Спостереження за проникненням паразита до прикріплення до хазяїна та в прегаусторіальний період можна проводити від 4 до 10 днів після зараження. Вовчок рідко проникає в корінь господаря до 6 днів, тоді як більшість гаусторіїв досягають внутрішніх тканин кореня (внутрішня кора до судин) через 8 днів. Перші прикріплення і перші горбики можна побачити через 8 днів та 15–20 днів після зараження відповідно. Розвиток бруньок з горбиків можна спостерігати після одного місяця культивування.

Коріння соняшнику досліджували в постгаусторіальний період на 30–35 день після зараження під стереоскопічним мікроскопом «МБС-10» для визначення загальної кількості та стадії розвитку прикріплень до коренів соняшнику та кількості некротичних прикріплень. Етапи визначення фенологічних стадій *Orobanche cumana* Wallr., на яких відбувається зараження або виникає резистентність гібридів соняшнику базувалися на наступній класифікації із невеликими змінами [8]. Використовувалися такі стадії розвитку: T00: відсутність проростання насіння вовчка, T0: відсутність прикріплення; T1: прикріплення сформовано, але фактичний горбик ще не видно; T2: горбик діаметром менше ніж 1 мм; T3: горбик діаметром більше ніж 1 мм і без видимих стеблових бруньок; T4: горбик з уже сформованими стебловими бруньками або ранніми стадіями

росту стебла. T00 — стадія до прикріплення до хазяїна, T0, T1 — прегаусторіальний етап, T2, T3, T4 — постгаусторіальний період.

Математичну обробку результатів досліджень проводили за загальновідомими методиками, визначаючи найменшу значущу різницю (НІР) та похибку середньої арифметичної. НІР — це своєрідна ціна поділу, яка дає змогу дослідним шляхом оцінити різницю в вибіркових середніх. Кожен параметр вимірювали у 20 рослин. Для вегетаційних експериментів вибірка вважається вірогідною, якщо у ній більше ніж 8 рослин.

Результати та обговорення

За результатами досліджень виявлено різну реакцію рослин гібрида соняшнику Р64LE99 на ураження паразитом, оброблених індукторами системної стійкості хімічного (препарат із саліцилової кислоти) і біологічного походження (препарат із трутовика справжнього) у порівнянні з контролем (без оброблення). На контрольному варіанті без обробки препаратами, що стимулюють імунітет рослин, відбулося середнє ураження вовчком гібрида Р64LE99. Близько 90 % рослин соняшнику були уражені паразитом. У середньому налічувалося 6 бруньок вовчка на одну рослину соняшнику (табл.).

Етапи зараження вовчком соняшника на контрольному варіанті спостерігалися у часі дуже точно і скориговано. Перші прикріплення на коренях вовчка відбувалися на 7–10 день, а утворення горбиків спостерігалось на 15–20 день. Розвиток бруньок з горбиків можна було спостерігати після одного місяця культивування.

Таблиця. Ступінь ураження вовчком соняшнику, обробленого препаратами, що індукують імунітет рослин

Гібрид	Селекція	Стійкість до вовчка	Кількість протестованих рослин, шт	Уражених, рослин, %	Ступінь ураження вовчком	Кількість бруньок вовчка на 1 уражену рослину (середнє значення)
Контроль (не оброблений варіант)						
Р64LE99	Піонер	A-E+система 2	20	90	середнє	6 ± 1,0
Варіант 1 (оброблений препаратом із саліцилової кислоти)						
Р64LE99	Піонер	A-E+система 2	19	20	слабке	2 ± 1,2
Варіант 2 (оброблений препаратом із трутовика)						
Р64LE99	Піонер	A-E+система 2	18	20	слабке	2 ± 1,1
НІР ₀₅						1,5

Примітки: ураження вовчком 7 і більше бульбочок на 1 уражену рослину (середнє значення) (7–10 балів) — сильне; 4–6 бульбочок (4–6 балів) — середнє; 1–3 бульбочки (1–3 бал) — слабке.

Слабше вовчком уражувалися рослини гібрида P64LE99 на варіантах, оброблених препаратом із саліцилової кислоти та трутовика справжнього. У середньому на одну рослину сояшнику припадало 2 бруньки паразита. На цих варіантах досліду вовчком було заражено 20 % рослин сояшнику. На оброблених препаратами рослинах сояшнику не було виявлено повністю стійких рослин до патогену.

На варіанті, обробленому препаратом із трутовика справжнього і саліцилової кислоти, спостерігалися випадки зупинки розвитку паразита у прегаусторіальний (під час проникнення в корінь) і постгаусторіальний (після встановлення судинних зв'язків) періоди зараження. Зазвичай проникнення вовчка при прегаусторіальній резистентності зупинялося в корі кореня сояшника на 7–10 день і пов'язано з потемнінням проростків паразита. При постгаусторіальній стійкості рух патогену гальмувався в ендодермі або після досягнення центрального циліндра на 15–20 день та викликав некроз горбиків, що не дає встановити ефективні судинні зв'язки з господарем через виникнення захисних реакцій. Проникнення вовчка при постгаусторіальній стійкості сояшника зупинялося через укріплення клітинної стінки не у корі кореня, а глибше в ендодермі або після досягнення центрального циліндра, вірогідно, через лігніфікацію ендодермальних і перициклічних клітин господаря, що запобігає проникненню паразита у судинний циліндр кореня або виникненню інших захисних реакцій.

Як правило, клітини рослини позбавлені лігніну під час вегетативної стадії, коли вовчок активно заражає коріння сояшнику. Лігніфікація клітин зазвичай починається під час формування вторинної клітинної стінки. Як тільки рослина починає цвісти, відбувається вироблення лігніну. Захисні реакції сояшнику від вовчка, що складаються з укріплення клітинної стінки через осадження на ній лігніну, суберину, накопичення калози, захисних білків, антимікробних речовин та перехресне зшивання білків, які перешкоджають проникненню паразита та зв'язку з судинною системою господаря, можуть бути активовані хімічним або біологічним шляхом на ранніх фазах розвитку рослин, коли відбувається зараження кореневої системи патогеном. Більшість цих захисних реакцій виникає вже через 1 день після зараження і досягає піку на 3 день.

Таким чином, інфікування сояшнику паразитом вовчком було зменшено шляхом індукції системної набутої резистентності після обробки рослин препаратами природного і синтетичного походження (трутовик справжній і саліцилова кислота). Зменшити інфікування гібридів сояшнику паразитом можна через індукцію системної набутої резистентності (SAR) препаратами, що викликають утворення АФК і запускають захисні реакції рослин через сигнальний шлях саліцилової кислоти (SA).

Зараз нами в Інституті харчової біотехнології та геноміки НАН України розробляється четверте покоління засобів захисту рослин, що стане основою у майбутньому для нової Зеленої революції. Ці препарати містять речовини, призначені не для знищення патогенів рослин, а для зменшення їхньої вірулентності та посилення захисних властивостей. Вони називаються еліситорами або індукторами системної стійкості рослин і являють собою речовини біотичної та абіотичної природи (ендогенні або екзогенні для рослини), які розпізнаються рослиною як сигнали небезпеки й у відповідь запускають захисні механізми, що дозволяють культурі зменшити вплив біотичного та абіотичного стресу. Еліситори після розпізнавання рослиною запускають сигнальні системи, які призводять до експресії генів, пов'язаних із захистом, і, відповідно, підвищують стійкість рослин до патогенів [9].

У сільськогосподарській практиці обробка рослин еліситорами (індукторами системної стійкості) за відсутності вірулентних патогенів дає захисну реакцію, що може забезпечити певний захист від подальших викликів патогенів (системну набуту резистентність — SAR). Це призводить до швидшої та сильнішої активації захисних реакцій на наступні біотичні та абіотичні стреси. Важливо, що це не відрізняється від рівня індукції резистентності у відповідь на розпізнавання справжніх патогенів, які потенційно здатні спричинити хворобу [10].

Еліситори відрізняються від звичайних синтетичних пестицидів тим, що в той час, як синтетичні пестициди діють безпосередньо на патогени та комах, еліситори діють безпосередньо на рослини, а не на патогени як сигнальні агенти (тобто в дуже низьких концентраціях), викликаючи імунну відповідь, яка дозволяє рослинам повністю реалізувати свій захисний генетичний потенціал. Цей ефект дозволяє рослинам використовувати власні метаболіти для боротьби з інфекціями та шкідниками. Дія еліситорів

не тільки індукує імунітет рослин, але також є багатофункціональною і може безпосередньо знищувати патогени рослин [11].

В останнє десятиліття індуктори стійкості рослин почали широко застосовуватися для захисту рослин. Ефективність агентів, що індукують системну стійкість рослин, може перевищувати ефективність стандартних пестицидів. Це підвищує ступінь захисту рослин від стресів і патогенів, одночасно підвищуючи врожайність і якість продукції. Це відкриває реальні перспективи для переходу від небезпечних агентів до сучасних біологічних методів захисту рослин від хвороб і шкідників. Потенціал цього напрямку тільки починає розкриватися. Його розвиток потребуватиме поглиблення і розширення фундаментальних досліджень молекулярних механізмів імунітету рослин, розробки нових методологій практичного застосування таких агентів і створення систем захисту, заснованих на використанні засобів захисту рослин, що індукують системну стійкість рослин і стимулюють захисні реакції на клітинному рівні [12].

Висновки

Обприскування рослин соняшнику гібрида Р64LE99, що штучно заражені паразитом вовчком, індукторами системної стійкості хімічного (препарат із саліцилової кислоти) і біологічного походження (препарат із трутовика справжнього) забезпечило контроль патогену на рівні 80 %. Препарати із саліцилової кислоти та трутовика справжнього знижують зараження соняшника вовчком шляхом індукції набутої системної резистентності, що характеризується запуском захисних реакцій рослин. Обробка рослин препаратами природного і синтетичного походження, що стимулюють імунітет рослин, як окремо, так і у комбінації з класичними фунгіцидами, може бути перспективною стратегією захисту соняшника від паразита вовчка із якіснішим збереженням навколишнього середовища й основою для створення препаратів четвертого покоління для захисту рослин.

References

1. Khablak S. H., Spychak V. M. Cellular mechanisms of resistance to the synopsis to the parasite *Orobanche cumana* Wallr. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Agronomy and Biology*. 2024. Vol. 57 (3). P. 82–91. <https://doi.org/10.32782/agrobio.2024.3.11>. [in Ukrainian]
2. Khablak S. H., Spychak V. M. Infection of different sunflower hybrids with different resistance to the parasite by Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). *Bulletin of Uman National University of Horticulture*. 2024. Vol. 2. P. 45–49. <https://doi.org/10.32782/2310-0478-2024-2-44-49>. [in Ukrainian]
3. Al-Khayri J. M., Rashmi R., Toppo V., Chole P. B., Banadka A., Sudheer W. N., Nagella P., Shehata W. F., Al-Mssallem M. Q., Alessa F. M. Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. *Metabolites*. 2023. Vol. 13 (6). P. 716. <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>.
4. Wang Y., Chantreau M., Sibout R., Hawkins S. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Front. Plant Sci*. 2013. Vol. 4. P. 220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00220>.
5. Tang L., Yang G., Ma M., Liu X., Li B., Xie J., Fu Y., Chen T., Yu Y., Chen W., Jiang D., Cheng J. An effector of a necrotrophic fungal pathogen targets the calcium-sensing receptor in chloroplasts to inhibit host resistance. *Mol Plant Pathol*. 2020. Vol. 21 (5). P. 686–701. <https://doi.org/10.1111/mpp.12922>.
6. Kukin V. F. Method of evaluation of sunflower for resistance to infestation. *Plant protection from pests and diseases*. 1960. Vol. 7. P. 39. [in Ukrainian].
7. Darkal A. K., Zuraik M. M., Ney Y., Nasim M. J., Jacob C. Unleashing the Biological Potential of *Fomes fomentarius* via Dry and Wet Milling. *Antioxidants*. 2021. Vol. 10 (2). P. 303. <https://doi.org/10.3390/antiox10020303>.
8. Martín-Sanz A., Malek J., Fernández-Martínez J. M., Pérez-Vich. B., Velasco L. Increased virulence in sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity. *Front Plant Sci*. 2016. Vol. 7. P. 589. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00589>.
9. Khablak S.G. The fourth generation of plant protection products: inducers of systemic plant resistance. *Acrobusiness Ukraine*. 2024. Vol. 4. P. 18–28. Retrieved from: <https://agrobusiness.com.ua/chetverte-pokolinnia-zasobiv-zakhystu-induktory-systemnoi-stiikosti-roslyn>. [in Ukrainian]
10. Gozzo F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J Agric Food Chem*. 2003. Vol. 51 (16). P. 4487–4503. <https://doi.org/10.1021/jf030025s>.
11. Ayilara M. S., Adeleke B. S., Akinola S. A., Fayose C. A., Adeyemi U. T., Gbadegesin L. A., Omole R. K., Johnson R. M., Uthman Q. O., Babalola O. O. Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Front Microbiol*. 2023. Vol. 14. P. 1040901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>.
12. Reglinski T., Havis N., Rees H. J., de Jong H. The Practical Role of Induced Resistance for Crop Protection. *Phytopathology*. 2023. Vol. 113 (4). P. 719–731. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-22-0400-IA>.

KHABLAK S. H.¹, SPYCHAK V. M.¹, ABDULLAIEVA Y. A.²

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baida-Vyshnevetskoho str., 2A

² ROSKOM LLC, Ukraine, Kotsyubynske

PROTECTION OF SUNFLOWER FROM THE PARASITE LUPUS (*OROBANCHE CUMANA* WALLR.) BY STIMULATING IMMUNITY

Aim. To study the possibility of stimulating sunflower immunity to protect against the broomrape parasite by inducers of plant systemic resistance of chemical and biological origin, which cause the formation of reactive oxygen species and trigger plant defense mechanisms through the salicylic acid (SA) signaling pathway. **Methods.** Sunflower resistance to broomrape treated with plant immunity inducing agents was evaluated in a pot experiment using a modified methodology. **Results.** Spraying of sunflower plants of P64LE99 hybrid artificially infected with broomrape parasite with inducers of systemic resistance of chemical (salicylic acid preparation) and biological origin (tinder fungus preparation) ensured control of the pathogen at 80 %. Preparations of salicylic acid and tinder fungus reduce the infection of sunflower by broomrape by inducing acquired systemic resistance, characterized by the launch of plant defense responses. **Conclusions.** The treatment of plants with preparations of natural and synthetic origin that stimulate plant immunity, either alone or in combination with classical fungicides, can be a promising strategy for protecting sunflower from the broomrape parasite with better environmental protection and the basis for the creation of the fourth generation of protective agents.

Keywords: *Orobancha cumana* Wallr., race, sunflower, hybrid, root system.