

8. Matveeva N. A., Shakhovskii A. M., Kuchuk N. V. Features of lettuce transgenic plants with *ifn-alpha2b* gene regenerated after *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // *Tsitol. Genet.* – 2012. – Vol. 46, №3. – P. 27–32.
9. Muir J. G., Shepherd S. J., Rosella O., Rose R., Barrett J. S., Gibson P. R. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55 (16). – P. 6619-6627.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Phys. Plant.* – 1962. – Vol. 15, №3. – P.473–497.
11. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 242 с.
12. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 143 с.

**YELISIEIEVA Y. V., MATVIEIEVA N. A.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine  
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho str., 148, e-mail: eliseevauv@ukr.net*

### **AGROBACTERIUM RHIZOGENES-MEDIATED TRANSFORMATION FOR THE INCREASE OF POLYFRUCTANS CONTENT IN ROOTS OF *LACTUCA SATIVA* L.**

**Aims.** The studing of *Lactuca sativa* L. “hairy” roots was the aim of the work. **Methods.** The roots were obtained via cocultivation of leaves with *Agrobacterium rhizogenes* with pCB161 vector (selective *nptII* gene, target *ifn-a2b* gene). Selection of transgenic roots was performed on Murashige and Skoog medium with twice reduced content of macrosalts, 600 mg/l cefatoxime and 25 mg/l kanamycine. **Results.** Transformed “hairy” root lines differed in biomass increase from 0,02±0,003 to 0,16±0,01 g fresh weight during 30 days and polyfructans content from 60,3±3,9 to 163,3±29,7 mg/g dry weight. The maximum total fructan content was found in the one line of Odessky Kucheriavets cv “hairy” roots and one line of Green Coral “hairy” roots cultivated during 30 days (0,137±0,002 mg and 0,15±0,01 mg respectively). **Conclusions.** Differences of biomass increase and polyfructans content was observed in both lines of roots. Probably, such differences connected by that each line is separate transgenic event.

*Key words:* transformation, *Agrobacterium*, *Lactuca sativa*, fructans.

**ЖУК І.В., ДМИТРІСВ О.П.**

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
Україна, 03680, м.Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: iren\_zhuk@mail.ru*

### **ІНДУКЦІЯ ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ ПШЕНИЦІ, ІНФІКОВАНОЇ ЗБУДНИКОМ СЕПТОРІОЗУ**

Ураження культурних рослин фітопатогенними грибами спричиняє значні втрати врожаю. Одним з найбільш поширених інфекційних хвороб пшениці є септоріоз. Збудник септоріозу гриб *Septoria tritici* вражає переважно листки і зменшує їх асиміляційну поверхню. Внаслідок цього порушується розвиток колоса, зменшується кількість зерен та формуються невивчені зернівки. Втрати врожаю навіть при помірному розвитку хвороби становлять 10-15%, а при епіфітотійному, яке трапляється раз у 2-3 роки – 30-50% [2]. Захист посівів за допомогою фунгіцидів не завжди є ефективним і викликає забруднення навколишнього середовища отрутохімікатами, а нові сорти досить швидко втрачають свою хворобостійкість. Альтернативною застосуванню пестицидів є біологічні мето-

ди захисту рослин, серед яких у першу чергу слід назвати індукування стійкості [1, 5]. Індукована стійкість є тимчасовою фенотиповою стійкістю, що базується на експресії багатьох генів, і тому є неспецифічною.

Речовини фітопатогенів, що викликають таку стійкість, називають біотичними еліситами. Останнім часом увага дослідників зосереджена на пошуку нових еліситорів та вивченні можливості їх поєднання з регуляторами сигнальних систем рослин. До числа останніх належить ендогенний оксид азоту (NO), який задіяний у реакції гіперчутливості. В наших попередніх дослідженнях показано, що обробка рослин донором NO – нітропрусидом натрію (НПН) – індукує неспецифічну стійкість у ярої пшениці в умовах польового досліду [2]. В подальшому

пошук нових ефективних еліситорів був продовжений, зокрема була використана щавлева кислота [3]. Відомо, що ця кислота здатна індукувати програмовану загибель рослинних клітин шляхом посилення утворення активних форм кисню (АФК) [7]. Виявилось, що щавлева кислота індукує підвищення активності пероксидази, яка бере участь у формуванні клітинної стінки, утилізації пероксиду водню та індукції неспецифічної стійкості молодих рослин озимої

### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сорти ярої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. – Недра та Етюд, які вирощували в умовах дрібноділянкових польових дослідів на сірому лісовому ґрунті в Київській області з використанням типової для зони агротехніки.

Обробку рослин водним розчином щавлевої кислоти 0,1 мМ та 0,5 мМ розчином донором оксиду – нітропрусида натрію проводили у фазі виходу в трубку з одночасною інокуляцією збудником септоріозу *Septoria tritici*. Саме ця фаза є найбільш чутливою до дії еліситорів, регуляторів росту і септоріозу. В попередніх дослідженнях нами встановлено, що саме ці концентрації розчинів щавлевої кислоти та НПП є найбільш ефективними. Сорт Етюд (заявник Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України) створено шляхом групового та наступних негативних доборів із гібридної популяції ТАМ 200 (США) x Turaco (Мексика). Сорт Недра (заявник – Національний науковий центр „Інститут землеробства НААН України”) похо-

### Результати та обговорення

Встановлено, що у чутливого до септоріозу сорту Етюд активність АПО в умовах зараження різко знижується (рис. 1, А).

Обробка щавлевою кислотою та донором NO на фоні штучного ураження незначно підвищує активність АПО, однак дія цих речовин на неуразнені рослини спричиняє значне підвищення активності АПО. В подальшому у фазі колосіння-цвітіння, коли завершується інкубаційний період розвитку хвороби, активність

м'якої пшениці до збудника септоріозу [3]. Реакція проявлялась через добу після штучного ураження і її досліджували протягом 19 діб. Однак подальший розвиток захисних реакцій в оброблених еліситором рослинах не був з'ясований.

Метою роботи було вивчення регуляторної ролі NO та щавлевої кислоти в індукції імунних відповідей рослин пшениці до септоріозу протягом онтогенезу.

дить від сортів вітчизняної селекції, зокрема сорту Дніпрянка. Таким чином, нами в умовах польового дослідів проведено порівняння стійкості до збудника септоріозу сортів різного походження. В якості маркера індукованої стійкості визначали активність цитоплазматичної пероксидази (КФ 1.11.1.7) у листках за методом Сіверс (1971) [9], аскорбатпероксидази (АПО) по Накано і Асада [8].

Відбір зразків проводили через добу після зараження і в подальшому протягом періоду колосіння-цвітіння та дозрівання зерна. Оцінку ураження та ступеню розвитку захворювання проводили у фазу молочно-воскової стиглості зерна з використанням 9-бальної шкали Саарі та Прескотта [4]. 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 програмного пакету Microsoft Excel.

АПО в уражених рослинах значно зростає і перевищує рівень контролю, а в оброблених еліситорами рослинах (контрольних та інфікованих) знижується. У фазі молочної стиглості зерна активність АПО у всіх варіантах зменшується, однак найбільше у варіанті з зараженням рослин септоріозом без обробки, що свідчить про значну деградацію клітин мезофілу листків, деструкцію пігментного комплексу та прискорення старіння уражених рослин.

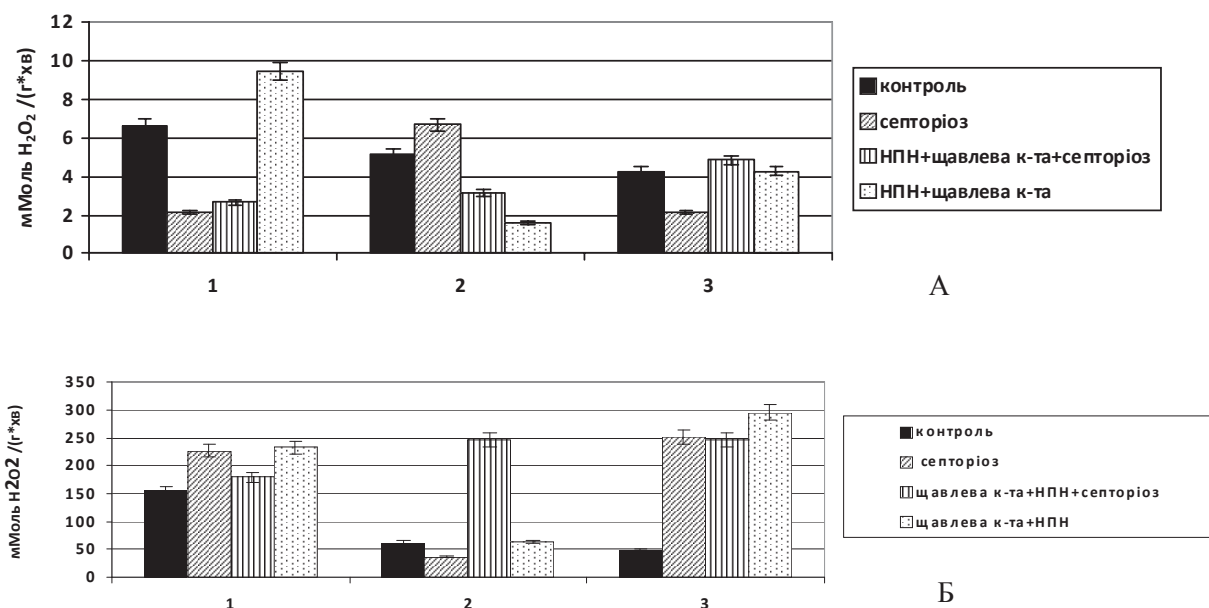


Рис. 1. Вплив обробки донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію та щавлевою кислотою на активність аскорбатпероксидази (А) та пероксидази (Б) в листках ярої пшениці сорту Етюд за умов ураження збудником септоріозу (1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна)

Відомо, що на відміну від АПО, цитоплазматична пероксидаза використовує в якості субстрату фенольні сполуки і задіяна у процесі лігніфікації клітинних стінок [7]. Індукція синтезу лігніну, яка супроводжується посиленням активності цитоплазматичної пероксидази, належить до первинних реакцій рослинної клітини на проникнення некротрофних фітопатогенних грибів. Встановлено, що у рослин пшениці сорту Етюд, попередньо оброблених щавлевою кислотою і донором NO та інфікованих збудником септоріозу активність пероксидази зростає у фазі виходу в трубку (рис. 1Б). Однак у фазі колосіння-цвітіння активність пероксидази зменшується у контролі, заражених рослин сорту Етюд та незаражених рослин за сумісної дії щавлевої кислоти та донору NO. У варіанті з зараженням септоріозом і обробкою донором оксиду азоту і щавлевою кислотою активність цитоплазматичної пероксидази залишається високою. У фазі молочної стиглості зерна відбувається підвищення активності цитоплазматичної пероксидази у всіх варіантах дослідження, крім контролю. Найвища активність пероксидази відмічена у варіанті з незараженими рослинами, обробленими донором оксиду азоту і щавлевою кислотою.

У ярої пшениці сорту Недра найвища активність АПО у фазі виходу в трубку виявлена у варіанті з зараженням септоріозом та обробкою

донором оксиду азоту і щавлевою кислотою (рис.2А). У фазі колосіння-цвітіння активність АПО у цьому варіанті залишається такою ж високою, як і у фазі виходу в трубку. У контролі активність АПО у фазі колосіння-цвітіння зростала, що свідчить про активізацію роботи фотосинтетичного апарату. У фазі молочної стиглості зерна активність АПО у контролі залишається на тому ж рівні, що і у попередній фазі, однак в інших варіантах вирівнюється. Тобто, обробка щавлевою кислотою та NO затримує деструкцію фотосинтетичного апарату у стійкого сорту ярої пшениці Недра у фазах виходу в трубку і колосіння-цвітіння. У фазі виходу в трубку активність цитоплазматичної пероксидази була високою у контролі, у варіанті з зараженням септоріозом рослин та обробкою донором оксиду азоту і щавлевою кислотою (рис.2Б). У фазі колосіння-цвітіння та молочної стиглості зерна активність цитоплазматичної пероксидази у всіх варіантах значно зменшується і залишається на одному рівні, що свідчить про індукцію захисних реакцій в період проникнення патогену у фазі виходу в трубку рослин пшениці. Зменшення активності цитоплазматичної пероксидази у фазах колосіння-цвітіння може бути обумовлене завершенням формування клітинних стінок і процесу лігніфікації та суберинізації.

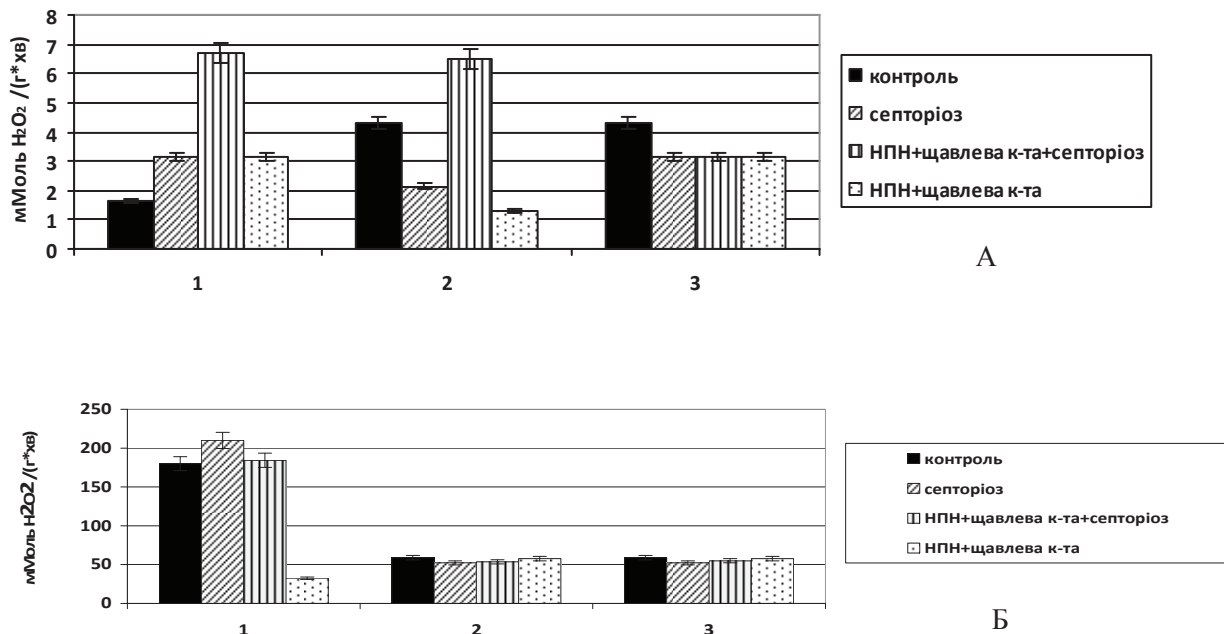


Рис. 2. Вплив обробки щавлевою кислотою та донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію (НПН) на активність аскорбатпероксидази (А), пероксидази (Б) в листках ярої пшениці сорту Недра за умов ураження збудником септоріозу (1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна)

Оцінка за шкалою Саарі та Прескотта показує, що у варіанті з обробкою донором NO і щавлевою кислотою була найнижча ступінь ураження листків у обох вивчених нами сортів пшениці, що дозволило їм сформувати вищий врожай, порівняно з необробленими рослинами. Однак сорт Недра виявляє підвищену стійкість до септоріозу, порівняно з сортом Етюд. Ураження необроблених рослин пшениці септоріозом було на 10-15% вищим, ніж у рослин, попередньо оброблених донором NO і щавлевою кислотою.

Аналіз структури врожаю показав, що в уражених септоріозом рослин зменшується висота, площа листової поверхні та кількість зе-

рен в колосі. Крім того, характерним є значне ураження зернівок, що проявляється у вигляді некротичних плям на поверхні сформованого зрілого зерна. Зернівки нерідко мали неправильну форму, були недостатньо виповненими. Обробка рослин донором NO та щавлевою кислотою затримує розвиток хвороби, що дозволяє рослинам розвинути більшу площу асиміляційної поверхні листків, збільшити висоту стебла порівняно з інфікованими рослинами, які не обробляли елісаторами. Захисна дія вивчених нами елісаторів призводить до зменшення ураження зернівок, що дозволяє сформувати виповнене зерно без некротичних плям, одночасно збільшується кількість зерен в колосі.

### Висновки

Дослідження динаміки активності АПО та цитоплазматичної пероксидази дозволило встановити, що формування відповіді на проникнення патогена відбувається у короткий проміжок часу і проявляється у підвищенні активності цитоплазматичної пероксидази, що індукує посилений синтез лігніну для механічного зміцнення

клітинної стінки. Зміни активності АПО відображають функціонування фотосинтетичного метаболізму в клітинах листового мезофілу. Використані нами елісатори індукують захисні реакції, які стримують розвиток септоріозу у рослин пшениці.

## Література

1. Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М., Полищук В.П. Индуцирование системной устойчивости у растений биогенными индукторами // Вісник Харківського націон. аграрного ун-ту. Серія Біологія. – 2005. – №3. – С. 24-36.
2. Жук І.В., Дмитрієв О.П. Вплив екзогенного оксиду азоту на індукування неспецифічної стійкості ярої пшениці в польових умовах// Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. НАН України, НААН України, НАМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. Т.3: присв. 125-річчю від дня народження М.І. Вавилова – К.: Логос, 2012 – С. 440-445.
3. Жук І.В., Лісова Г.М., Довгаль З.М., Дмитрієв О.П. Індукування щавлевою кислотою стійкості рослин пшениці *Triticum aestivum* L. до ураження септоріозом // Тезиси докладов Научно-практической конференції “Адаптационные стратегии живих систем», 11-16 июня, 2012, Новый Свет, Украина. – Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2012. – С. 251-252.
4. Методи селекції и оцінки стійкості пшениці и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. – Прага, 1988. – 321 с.
5. Озерецковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений к вирусам биогенными элиситорами фитопатогенов // Прикл. биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30. – С. 325–339.
6. Hancock J. T., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Neill S. J. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species // Plant Physiol. Biochem. – 2002. – Vol. 40. – 611–617.
7. Kyoung Su Kim, J.-Y. Min, M. B. Dickman. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development //Molecular-plant microbe interactions. – 2008. – Vol. 21, №5. – P. 605–612.
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. Seevers P. M., Daly J., Catedral F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease // Plant Physiol. – 1971 – Vol. 48, №3. – P. 353-360.
10. Takahama U., Oniki T. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in apoplast of spinach leaves by ascorbate // Plant Cell Physiol. – 1992 – Vol. 33, №4 – P. 379-387
11. Xu M.-J., Dong J.-F., Zhu M.-Y. Nitric Oxide Mediates the Fungal Elicitor-Induced Hypericin Production of *Hypericum perforatum* Cell Suspension Cultures through a Jasmonic-Acid-Dependent Signal Pathway // Plant Physiology. – 2005. – Vol. 139. – P. 991–998.

**ZHUK I.V., DMITRIEV A.P.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering*

*Ukraine, 03680, Kyiv, 148 Acad. Zabolotnoho St., e-mail iren\_zhuk@mail.ru*

## **INDUCTION OF WHEAT DEFENSE RESPONSES AGAINST *Septoria tritici* AGENT**

**Aims.** The usage of biological elicitors for plant defense responses against plant pathogenic fungi may initiate tolerance of plants and prevent environmental pollution. The aim of research was to investigate the regulator role of NO and oxalic acid in induction of wheat defense responses against *Septoria tritici* agent during ontogenesis. **Methods.** The peroxidase and ascorbateperoxidase were measured in leaves of spring wheat plants varieties Nedra and Etud upon treatment of donor NO – sodium nitroprusside – and oxalic acid and leaf blotch infection during ontogenesis. The morphometric parameters, degree of plant lesion and yield structure were analyzed. **Results.** Results obtained suggest that biotic elicitors - nitric oxide (NO) and oxalic acid induce wheat two cultivars (Nedra and Etud) defense responses against leaf blotch agent *Septoria tritici*. Initiation of defense responses in elicitor-treated plants occurs in a short period of time. Biochemical nature of defense responses elicitation revealed an increase activity of cytoplasmic peroxidase (CP) which induces lignin synthesis for mechanical strengthening of the cell wall. It is also shown that changes in activity of ascorbateperoxidase (APO) reflect the functioning of the photosynthetic metabolism in leaves cells mesophyllous.

**Key words:** wheat, *Septoria tritici*, NO, oxalic acid, plant defense responses.