

ЖУК І. В.<sup>1</sup>✉, ДМИТРИЄВ О. П.<sup>1</sup>, ЛІСОВА Г. М.<sup>2</sup>, КУЧЕРОВА Л. О.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: ivzhukvi@gmail.com

<sup>2</sup> 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

## ВПЛИВ КОЄВОЇ КИСЛОТИ ТА ДОНОРА NO НА *TRITICUM AESTIVUM* L. ЗА УМОВ БІОТИЧНОГО СТРЕСУ

**Мета.** Використання біотичних еліситорів для індукції неспецифічної стійкості рослин дозволяє зменшити забруднення навколишнього середовища пестицидами. Пероксид водню є сигнальною молекулою у рухах проростів, регуляції фотосинтетичного статусу; системна стійкість рослин до патогенів також залежить від H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Нашими попередніми дослідженнями виявлено вплив біотичних еліситорів на вміст H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в рослинах. Коєва кислота інгібує активність тирозинази у синтезі меланіну. У взаємодії рослина-патоген меланін відіграє роль у рості гіф гриба. Метою досліджень було проаналізувати вплив на рослини пшениці за біотичного стресу в польових умовах обробки коєвою кислотою та донором оксиду азоту. **Методи.** Протягом онтогенезу визначали вміст у листках рослин пшениці озимої сорту Легенда Миронівська пероксида водню та морфометричні параметри. Після дозрівання зерна проводили аналіз структури врожаю. **Результати.** Поєднання донора NO та коєвої кислоти зменшувало вміст H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та збільшувало врожайність. **Висновки.** Комбінація коєвої кислоти та донора оксиду азоту може бути використана в якості біотичного еліситора.

**Ключові слова:** пшениця озима, коєва кислота, біотичні еліситори, індукована стійкість, *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici* Rob. et Desm.

Екологічна безпека посівів важливих продовольчих культур вимагає розробки нових засобів, які здатні стимулювати адаптивний потенціал рослин за умов дії біотичних стресів. Перспективним у цьому напрямку є використання біотичних еліситорів, що дозволить активувати природні захисні механізми рослин та зменшити пестицидне навантаження на довкілля. Тому триває пошук нових еліситорів та їх композицій для індукування імунного потенціалу рослин.

Оксид азоту (NO) є сигнальною молекулою, що активує антиоксидантні захисні системи [1]. Коєва кислота здатна утворювати стабільні комплекси з ацетатами металів і, таким чином, впливати на іонний баланс у рослинних клітинах [2]. Раніше нами встановлено, що обробка рослин пшениці комбінацією біотичних еліситорів із донором NO знижувала ступінь їх ураження фітопатогенними грибами [3–5].

**Метою** нашої роботи було випробування коєвої кислоти в якості біотичного еліситора для дослідження індукції стійкості *Triticum aestivum* L. до *Septoria tritici* Rob. et Desm. шляхом обробки водним розчином і порівняння з впливом на рослини за комбінації з донором сигнальної молекули – оксиду азоту.

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

Дослідження проводилися в польових умовах Правобережного Лісостепу України. Рослини пшениці обприскували 0,1 мМ водним розчином коєвої кислоти та 0,5 мМ розчином донора оксиду азоту (нітропрусиду натрію, НПН) у фазі виходу в трубку, на третю добу після чого проводили інокуляцію збудником септоріозу листя *S. tritici* у концентрації 10<sup>6</sup> спор/мл із застосуванням прилипача.

У якості маркера індукованої стійкості визначали в прапорцевих листках вміст пероксида водню за реакцією з сульфатом титану [6]. 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 [7]. У цей же період визначали морфометричні параметри – висоту рослин, довжину колоса та пра-

порцевого листка. Після дозрівання зерна проводили аналіз структури врожаю. Повторність досліду триразова. Результати обробляли статистично з використанням ANOVA.

З'ясовано, що у фазу виходу в трубку у листках пшениці озимої сорту Легенда Миронівська за обробки донором оксиду азоту вміст ендogenous пероксиду водню знижувався в неінюкульованих листках, а за присутності фітопатогена зростав (рис. 1). Встановлено, що протягом наступної фази вегетативного періоду вміст цієї сигнальної молекули, навпаки, знижувався у варіанті з інфікуванням збудником септоріозу (рис. 1). Таким чином, у період переходу збудника *S. tritici* від латентного періоду до некротрофних проявів попередня індукція донором оксиду азоту антиоксидантної системи знижувала рівень пероксиду водню, наближуючи його до контролю (рис. 1). Через аномально високу температуру повітря та посушливість вегетаційного сезону 2018 року протягом періоду формування колосу, візуальні прояви септоріозу листя були пригнічені на кінцевих етапах розвитку інфекції (відсутність пікнід або їх невелика кількість, за шкалою Саарі-Прескотта – слабкий ступінь ураження). Очевидно, це стало однією з причин відсутності суттєвої різниці у фазу молочно-воскової стиглості зерна між рівнем ендogenous пероксиду водню в оброблених доно-

ром оксиду азоту рослин у варіантах без грибного патогена та з ним (рис. 1). NO здатний впливати як безпосередньо на пул  $H_2O_2$ , так і через регуляцію активності антиоксидантних ферментів, зокрема пероксидази [8–10].

Під час застосування коевої кислоти в якості біотичного елісатора у сорту пшениці озимої Легенда Миронівська вміст ендogenous пероксиду водню у листках, інфікованих збудником септоріозу листя рослин, знижувався протягом усього вегетаційного періоду. З'ясовано, що найнижчий рівень пулу ендogenous пероксиду водню за дії коевої кислоти був у період колосіння-цвітіння (рис. 2). Таким чином, вплив на пул ендogenous пероксиду водню коевої кислоти виявився більш значним, аніж донора оксиду азоту. Однак наприкінці вегетації пул  $H_2O_2$  у листках озимої пшениці не вирівнювався, як у випадку з донором оксиду азоту, в інфікованих та неінфікованих рослин. Встановлено, що у попередньо оброблених коевою кислотою рослинах рівень ендogenous пероксиду водню за дії біотичного стресу в період молочно-воскової стиглості був нижчим, аніж у неінфікованих. Очевидно, це свідчить про те, що вплив коевої кислоти на вміст пероксиду водню відбувається за рахунок індукції тих шляхів, які більш чутливі до інфекції (рис. 2).

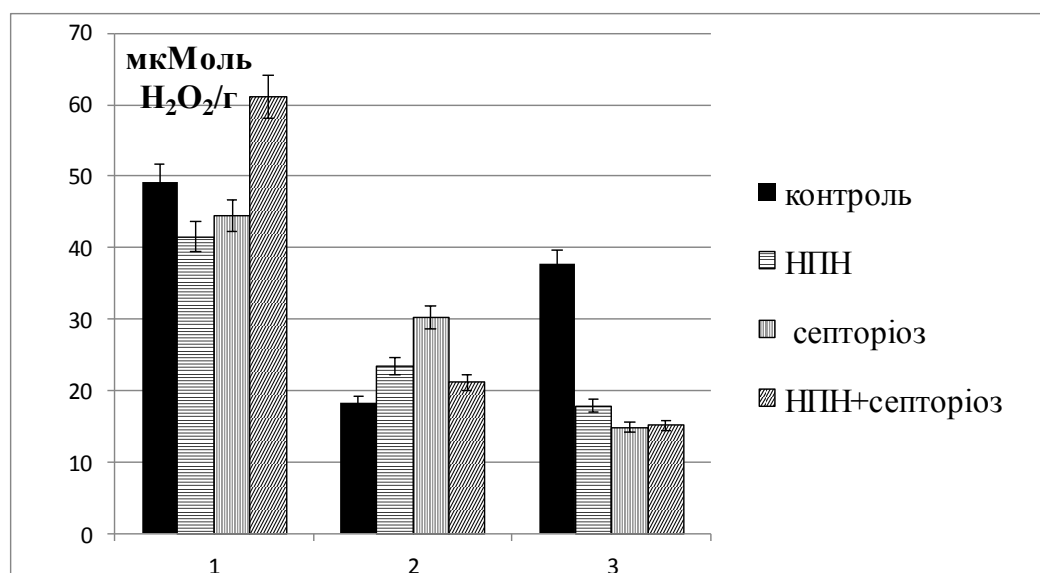


Рис. 1. Вміст ендogenous пероксиду водню в листках пшениці озимої сорту Легенда Миронівська за дії донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (НПН) та інфікування збудником септоріозу листя (1 – фаза виходу в трубку; 2 – колосіння-цвітіння; 3 – молочно-воскова стиглість).

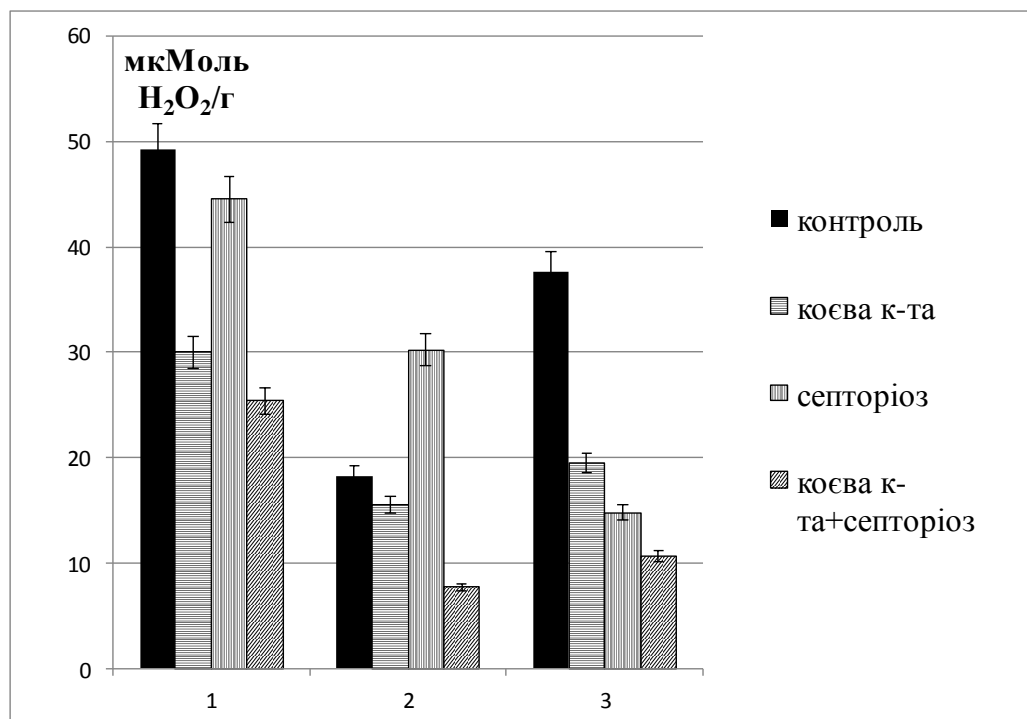


Рис. 2. Вміст ендogenous пероксиду водню в листках пшениці озимої сорту Легенда Миронівська за біотичного елісатора коєвої кислоти та інфікування збудником септоріозу: 1 – фаза виходу в трубку; 2 – колосіння-цвітіння; 3 – молочно-воскова стиглість.

Доведено, що сумісний вплив донора оксиду азоту та коєвої кислоти суттєво знижував вміст ендogenous пероксиду водню в інфікованих збудником септоріозу листя рослинах пшениці озимої протягом вегетації, мінімальні значення були у фазі молочно-воскової стиглості (рис. 3).

Встановлено, що при цьому сумісний вплив донора оксиду азоту та коєвої кислоти за своїм ефектом був більш наближений до впливу коєвої кислоти. Таким чином, активація антиоксидантної системи та регуляція пулу ендogenous пероксиду водню коєвою кислотою здатна модифікувати вплив NO-сигнальної системи. Порівняння з дією окремо коєвої кислоти показує, що наявний синергізм під кінець вегетаційного періоду – зниження вмісту пероксиду водню у випадку комбінованої обробки більш значне, аніж окремо за дії коєвої кислоти.

Таким чином, комбінація коєвої кислоти як біотичного елісатора та донора сигнальної молекули знижувала вміст ендogenous пероксиду водню в листках.

Встановлено, що у сорту пшениці озимої Легенда Миронівська донор оксиду азоту на висоту рослин впливав несуттєво, коєва кислота також, а от комбінація донора NO та біотичного елісатора виявляла синергічний ефект. Виявлено, що маса колосу при цьому у сорту пшениці озимої Легенда Миронівська в інфікованих збудником септоріозу листя рослинах також зростала за впливу комбінації біотичного елісатора та донора сигнальної молекули. Коєва кислота та донор оксиду азоту теж стимулювали зростання маси колосу в інфікованих рослинах, але у неінфікованих рослинах коєва кислота не впливала на цей параметр. З'ясовано, що вплив на продуктивність пшениці озимої сорту Легенда Миронівська виявився синергічним за комбінації нітропрусиду натрію з коєвою кислотою. Встановлено, що кількість зерен у колосі у сорту пшениці Легенда Миронівська зростала в інфікованих рослин за дії коєвої кислоти та сумісного впливу коєвої кислоти з донором сигнальної молекули (рис. 4).

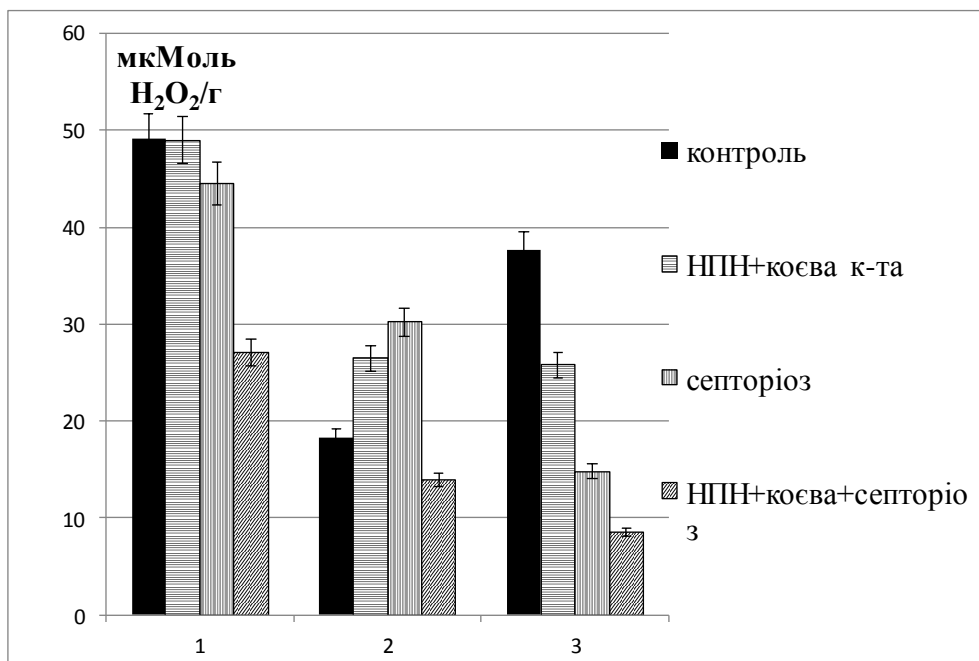
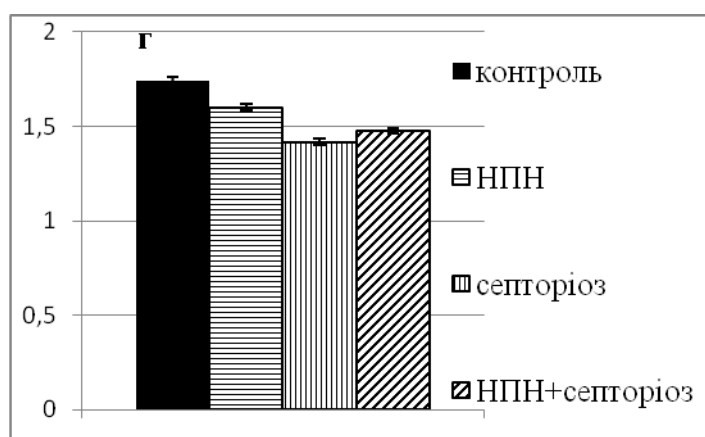
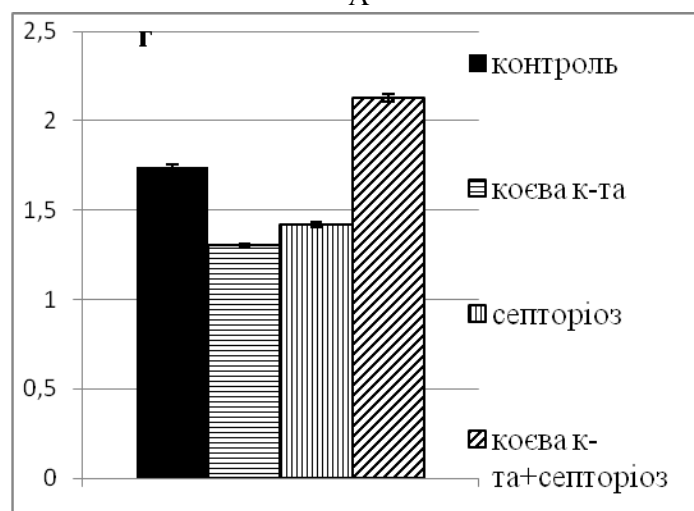


Рис. 3. Вміст ендогенного перексиду водню в листках пшениці озимої сорту Легенда Миронівська за дії донора оксиду азоту нітропрусида натрію (НПН), біотичного елісатора коєвої кислоти та інфікування збудником септоріозу (1 – фаза виходу в трубку; 2 – колосіння-цвітіння; 3 – молочно-воскова-стиглість).



А



Б

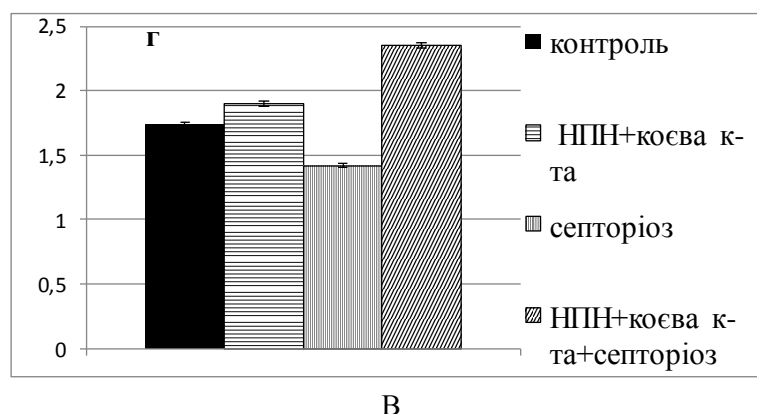


Рис. 4. Маса зерен із колосу пшениці озимої сорту Легенда Миронівська за дії донора оксиду азоту (нітропрусида натрію, НПН) (А), біотичного елісатора (коєвої кислоти) (Б), сумісного впливу донора сигнальної молекули та біотичного елісатора (В).

### Висновки

Встановлено, що у польових умовах попередня обробка коєвою кислотою шляхом обприскування в рослин пшениці озимої сорту Легенда Миронівська виявила її потенціал як біотичного елісатора. Комбінація коєвої кислоти з донором сигнальної молекули оксиду азоту за дії біотичного стресу стимулює зростання маси колосу, маси зерен з колосу та їх кількості. Аналіз біохімічних механізмів показав, що індуку-

вання стійкості здійснюється за рахунок активації антиоксидантного захисту рослин, внаслідок чого відбувається зниження та стабілізація пулу ендogenous пероксиду водню в листках пшениці. Виявлено, що коливання рівня  $H_2O_2$  в оброблених коєвою кислотою рослинах пшениці на різних фазах онтогенезу залежали від етапу розвитку фітопатогенного гриба, зокрема його переходу від латентного періоду до некротрофної стадії.

### References

- Nabi R.B.S., Hussain T.R., Kulkarni A., Bong-Gyu K.P.I., Mun B.G., Yun B.-W. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress *Environmental and Experimental Botany*. 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>.
- Liu X., Qixing J., Xia W. One-step procedure for enhancing the antibacterial and antioxidant properties of a polysaccharide polymer: Kojic acid grafted onto chitosan International. *Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 113. P. 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.007>.
- 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] / Жук І.В., Лісова Г.М., Дмитрієв О.П. Вплив щавлевої кислоти та нітропрусида натрію на продуктивність і стійкість озимої пшениці до збудників септоріозу та бурої іржі. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. 2017. Вип. 2 (41). С. 68–76.
- 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] / Жук І.В., Дмитрієв О.П., Лісова Г.М., Кучерова Л.О. Участь ферулової кислоти в індукуванні стійкості рослин озимої пшениці проти збудника септоріозу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 190–193.
- 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 ферулової кислоти для індукування стійкості *Triticum aestivum* проти *Septoria tritici*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 22. С. 240–245.
- 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. Основы селекции и методологии оценки устойчивости пшеницы к возбудителям болезней. Одесса: ВМВ. 2014. 401 с.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 1981. Vol. 22. P. 867–880.
- Moural T.W., Lewis K.M., Barnaba C., Zhu F., Palmer N.A., Sarath G., Scully E.D., Jones J.P., Sattler S.E., Kang Ch.H. Characterization of class III peroxidases from switchgrass. *Plant Physiol*. 2017. Vol. 173 (1). P. 417–433. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.16.01426>.

9. 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>.
10. Smirnoff N., Arnaud D. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist.* 2019. 221. P. 1197–1214. doi: 10.1111/nph.15488.

**ZHUK I. V.<sup>1</sup>, DMITRIEV A. P.<sup>1</sup>, LYSOVA G. M.<sup>2</sup>, KUCHEROVA L. O.<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup> *Institute of Plant Protection of Natl. Acad. Agrar. Sci. Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: mail\_gl@ukr.net*

#### **THE INFLUENCE OF KOJIC ACID AND DONOR NO ON *TRITICUM AESTIVUM* L. UNDER BIOTIC STRESS**

**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 (HP) is a signal molecule for photosynthetic status and for stomatal movements, and systemic acquired resistance to pathogens in plants proposed to be dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It is shown in our previous research that biotic elicitors influence on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in plants. Kojic acid inhibits tyrosinase activity in melanin synthesis. In plant-pathogen interaction melanin plays role for filaments growth of fungal agent. The aim of research was to analyze in field trials effect of kojic acid with additional donor NO treatment of winter wheat under biotic stress. **Methods.** Content of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured in kojic acid and NO donor treated wheat plants (cv. Legenda Myronivska) during different ontogenesis phases. The extent of morphometric parameters and yield structure were analyzed. **Results.** The data obtained suggest that kojic acid and donor NO decreased the HP content in wheat leaves and increased the grain number and yield. **Conclusions.** Kojic acid with donor NO is effective combination and could be used as biotic elicitor.

**Keywords:** winter wheat, kojic acid, NO, biotic elicitors, induced resistance, *Triticum aestivum* L., *Septoria tritici* Rob.et Desm.