

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ШТУБЕЙ

Татьяна Юрьевна

**ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ВОЗРАСТНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ
К ВОЗБУДИТЕЛЮ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ *Puccinia triticina* Erikss.**

Специальность 03.00.12 – физиология и биохимия растений

03.00.24 – микология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2009

Работа выполнена на кафедре селекции, генетики и физиологии растений
ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Плотникова Людмила Яковлевна

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук
Зайцева Людмила Григорьевна,
доктор биологических наук
Карпук Василий Васильевич

Ведущая организация – Главный Ботанический сад
им. Н.В. Цицина РАН

Защита состоится 13 ноября 2009 г. в 15.30. на заседании диссертационного
совета Д.501.001.46 при биологическом факультете МГУ
им.М. В. Ломоносова
по адресу: 119992, ГСП-2, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, к. 12, ауд. М-1.
тел / факс (495)9394309

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факульте-
та МГУ им.М. В. Ломоносова

Автореферат разослан 9 октября 2009 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета –
кандидат биологических наук



М. А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из наиболее вредоносных заболеваний мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. является бурая ржавчина, вызываемая биотрофным грибом *Puccinia triticina* Erikss. Патоген отличается быстрыми темпами эволюции, в его популяциях появляются и накапливаются новые агрессивные расы, что приводит к регулярной потере устойчивости сортами. Ежегодные потери урожая от бурой ржавчины составляют 5-15%, а в годы эпифитотий – 45-70% (Санин, 1995; Лебедев, 2000). В связи с этим высоко актуальны исследования физиологических механизмов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине.

Для стабильной защиты пшеницы от болезни учеными международного центра CIMMYT была сформулирована концепция неспецифической устойчивости по принципу замедления развития болезни – «медленное ржавление» (slow rusting) (Caldwell, 1968) или «частичной устойчивости» (Parlevliet, 1979). Генетическую защиту таких сортов составляли гены возрастной устойчивости, которые в сочетании с 2–3 генами обеспечивали длительную защиту растений (Parlevliet, 1979; Singh et al., 2003).

Несмотря на высокую эффективность сортов с частичной устойчивостью в защите растений физиологические механизмы возрастной устойчивости практически не исследованы. Не известны особенности взаимодействия патогена с растениями, определяющие неспецифическую устойчивость сортов. Представляет интерес изучение эффективности генов возрастной устойчивости к бурой ржавчине в регионах России, различающихся климатическими условиями и составом популяции *P. triticina*. Не изучены цитофизиологические проявления действия генов возрастной устойчивости и формирование признака в онтогенезе. Представляет интерес изучение проявления генов в разных комбинациях. Исследования перечисленных вопросов важны для обеспечения длительной защиты пшеницы от ржавчины.

Диссертационная работа выполнена в ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» (ОмГАУ) в период с 2005 по 2009 гг. в рам-

ках темы «Изучение цитофизиологических механизмов длительной и индуцированной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине» (№ Гос. регистрации 0120.0 509874).

Цель работы. Определение цитофизиологической основы возрастной устойчивости мягкой пшеницы к бурой ржавчине.

Задачи исследований:

1. Исследовать эффективность генов возрастной устойчивости к бурой ржавчине в условиях континентального климата юга Западной Сибири на наборе изогенных линий сорта мягкой пшеницы Тэтчер.

2. Выявить цитологические особенности взаимодействия *P. triticina* с растениями, защищенными генами возрастной устойчивости.

3. Изучить формирование признака устойчивости в онтогенезе.

4. Исследовать роль активных форм кислорода в защите линий с генами возрастной устойчивости от *P. triticina*.

5. Изучить роль синтеза каллозы в защите линий с генами возрастной устойчивости от болезни.

6. Выявить значение синтеза фенольных соединений в возрастной устойчивости.

7. Исследовать роль индуцированной устойчивости в защите линий от *P. triticina*.

8. Выявить механизмы устойчивости растений с комбинациями генов возрастной устойчивости и их воздействие на развитие патогена.

Научная новизна исследований. Впервые исследована эффективность набора генов возрастной устойчивости к бурой ржавчине на юге Западной Сибири (г. Омск). Установлены характерные черты взаимодействия *P. triticina* с группой линий, защищенных генами возрастной устойчивости. Продемонстрировано формирование возрастной устойчивости в онтогенезе. Выявлены цитофизиологические механизмы устойчивости в форме синтеза активных форм кислорода, каллозы, фенольных соединений, а также подавление формирования инфекционных структур, связанное с отсутствием сти-

мулов для их развития. Установлена роль индуцированной устойчивости в защите растений. Выявлены механизмы, усиливающие защиту гибридов F_1 с комбинациями генов возрастной устойчивости.

Теоретическая значимость работы. Впервые выявлены цитофизиологические основы возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине и показано формирование признака в онтогенезе. Выявлены особенности проявления отдельных генов возрастной устойчивости. Получены доказательства роли системной приобретенной устойчивости, стимулированной биотическими индукторами в защите растений. Выявлены характерные особенности взаимодействия *P. triticina* с линиями, определяющие неспецифическое действие генов возрастной устойчивости.

Практическая значимость работы. Определены эффективные в Западной Сибири гены возрастной устойчивости и их комбинации. Данные о механизмах действия отдельных генов, а также времени проявления признака в онтогенезе учтены при разработке программы создания сорта пшеницы. Информация о дифференциальном взаимодействии химических индукторов приобретенной устойчивости с различными генотипами растений важна для построения интегрированной защиты растений.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены: на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и образования» (Самара, 2005 г.); Региональной научно-практической конференции «Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве, растениеводстве и экономике» (Томск, 2005); II Всероссийском съезде по защите растений «Фитосанитарное оздоровление агроэкосистем» (С-Петербург, 2005 г.); Международной научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 70-летию НГАУ (Новосибирск, 2006 г.); конференции, посвященной 119-летию Н.И. Вавилова «Вавиловские чтения – 2006» (Саратов, 2006г.); Международной конференции «Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК» (Москва, 2007 г.); Международной конфе-

ренции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства» (Москва, 2007 г.); II Всероссийской конференции «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (С-Петербург, 2008 г.); XIII Всероссийской научно-практической конференции «Селекция и семеноводство сельскохозяйственных культур» (Пенза, 2009 г.).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 11 работ, в том числе публикации в журналах, рекомендованных ВАК – 2, материалы международных конференций – 4, всероссийских съездов, конференций – 3.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, выводов и приложения. Текст изложен на 169 страницах, содержит 9 таблиц, 32 рисунка, включает 55 микрофотографий. Список литературы включает 195 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

В обзоре литературы освещены биологические особенности возбудителя бурой ржавчины пшеницы. Рассмотрена проблема придания культурным растениям длительной устойчивости к болезням и представления о способах ее решения. Приведены сведения об особенностях фенотипического проявления генов возрастной устойчивости. Описаны механизмы устойчивости, формирующиеся при взаимодействии биотрофных патогенов с растениями.

2. Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили:

– растения яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Тэтчер и его изогенных линий (линии TcLr) с генами возрастной устойчивости Lr12, Lr13, Lr22a, Lr34, Lr35 и Lr37. Гены Lr12, Lr13 и Lr34 получены из сортов мягкой пшеницы, тогда как остальные гены являются результатом интрог-

рессии: ген Lr22a перенесен от *Aegilops tauschii*, ген Lr35 - от *A. speltooides*, ген Lr37 - от *A. ventricosa*;

- растения линии с геном Lr2a, проявляющимся на стадии проростков;
- растения гибридов F₁ между линиями сорта Тэтчер с генами возрастной устойчивости.

В качестве контроля в полевых и лабораторных исследованиях использовали растения восприимчивого к бурой ржавчине сорта мягкой пшеницы Саратовская 29.

Развитие бурой ржавчины в полевых условиях изучали на естественном умеренном (2006 г.) или интенсивном (2005, 2007 гг.) инфекционном фоне. В экспериментах определяли тип реакции по 5-балльной шкале (0 – иммунитет, 4 – восприимчивость) (Mains, 1926) и степень поражения растений (%) (Peterson, 1948). Для построения кривых развития болезни степень поражения оценивали в динамике с момента проявления ржавчины до созревания растений. На стадии молочно-восковой спелости растений учитывали распределение пустул по типу реакции и количество спор в пустулах.

Исследования действия генов устойчивости осуществляли на вазонных растениях на разных этапах онтогенеза - стадиях проростков, выхода в трубку и колошения. Эксперименты проводили на отсеченных листьях, жизнеспособность которых поддерживалась 0,004%-ным раствором бензимидазола (Михайлова, 1983). Для заражения листьев использовали изоляты 77 расы с генотипом P₉P₁₉P₂₄P₂₈, выделенные из полевой популяции, к которым растения были восприимчивы на стадии проростков.

Гистологические исследования развития гриба на поверхности и в тканях, а также проявление реакции сверхчувствительности (СВЧ) проводили на целых листьях, окрашенных анилиновым синим в лактофеноле. Генерацию растениями супероксид-аниона O₂⁻ выявляли путем витального окрашивания листьев нитросиним тетразолием (Heath, 1998). Каллозу (β-1,3-глюкан) на стенках клеток определяли окрашиванием кораллином (Барыкина, 2004). Комплекс фенольных веществ в цитоплазме и лигнин выявляли окрашивани-

ем серноокислым анилином (Джапаридзе, 1953), а также по их автофлуоресценции (Rubiales, 1996). Транскоричный альдегид в составе фенолов определяли окраской флороглюцином (Beardmore, 1983), сиригин – хлорсульфитным методом (Ride, 1975).

Для изучения механизмов системной приобретенной устойчивости (systemic acquired resistance – SAR) в качестве биоиндуктора использовали инокулюм, полученный размножением популяционного сбора непатогенного для пшеницы возбудителя корончатой ржавчины овса *Puccinia coronata* Corda. Для индукции устойчивости в полевых условиях в делянках чередовали рядки линий пшеницы и восприимчивого к *P. coronata* сорта овса. Биоиндукцию устойчивости в лабораторных условиях проводили путем нанесения на нижнюю половину 2-го листа инокулюма *P. coronata*, через 2 дня растения заражали спорами *P. tritricina*. Одновременно изучали проявление SAR, индуцированной разными химическими индукторами: 0,01% водными растворами янтарной и арахидоновой кислот, 0,00015% раствором Биона (бензотиадиазол CGA245704) (Gorlach, 1996; Список пестицидов, 2002; Тютереv, 2002).

Гистологические исследования проводили с помощью световых микроскопов Биолам-211 и МБИ-15. Автофлуоресценцию фенольных веществ изучали с помощью люминесцентного микроскопа Люмам-5. Микрофотосъемку осуществляли с помощью фотокамеры марки Olympus SP-320. Для статистической обработки вычисляли средние значения по данным экспериментов и ошибку средней (Доспехов, 1985).

3. Феноменологическое и цитологическое проявление возрастной устойчивости линий пшеницы к бурой ржавчине

Проявление возрастной устойчивости в полевых условиях

Изучение реакции сорта Тэтчер и его изогенных линий с генами возрастной устойчивости Lr12, Lr13, Lr22a, Lr34, Lr35, Lr37 на заражение бурой

ржавчиной проводили в полевых условиях в лесостепной зоне юга Западной Сибири (г. Омск) в течение 2005–07 гг.

В период наблюдений метеорологические условия были различными: высокие температуры в июле-августе отмечались в 2005 г., низкие температуры – в 2006 и 2007 гг. Сорт Тэтчер с геном Lr22b был восприимчив к болезни, что свидетельствует о неэффективности гена Lr22b в условиях Западной Сибири (рис. 1). Линии с другими генами были устойчивы. Устойчивость имела количественное проявление, то есть наблюдалась низкая степень поражения, но реакция растений, как правило, была восприимчивой (тип реакции 3-4 балла). Растения линий TcLr12, TcLr35 и TcLr37 были высоко устойчивы, и развитие болезни на них быстро стабилизировалось, а на линии Lr22a было существенно замедлено. Самую высокую устойчивость (степень поражения не более 20%) и наименьшую температурную чувствительность проявила линия TcLr37.

Поражение линий TcLr13 и TcLr34 было интенсивнее при повышенных температурах воздуха, что демонстрирует зависимость действия генов от температуры. Поражение их верхних листьев было ниже, чем листьев, сформировавшихся в более молодом возрасте, то есть устойчивость линий усиливалась в онтогенезе. Это отражалось на графике в виде загиба кривых (рис.1).

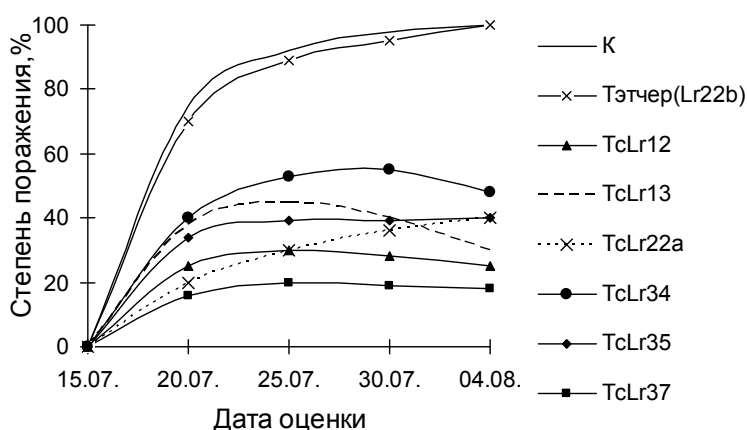


Рис. 1. Кривые развития бурой ржавчины на сорте Тэтчер и изогенных линиях с генами возрастной устойчивости (2005г.).

К – сорт Саратовская 29.

По мнению ряда ученых, для растений с частичной устойчивостью характерно развитие крупных пустул (тип реакции 3-4 балла), но низкая степень поражения (Parlevliet, 1979; Caldwell, 1968). Нами было показано, что на

линиях TcLr12, TcLr13, TcLr22a наблюдалось значительное количество пустул с типом реакции 1-3 балла (некроз и хлороз), что свидетельствует об особенностях их защитных механизмов. В то же время линии TcLr34, TcLr35 и TcLr37 демонстрировали в основном восприимчивую реакцию, как и восприимчивые сорта Саратовская 29 и Тэтчер. В зависимости от года и линии количество спор в пустулах, развивающихся на линиях с эффективными генами возрастной устойчивости, было меньше по сравнению с контролем в 1,5 – 5 раз.

Таким образом, полученные результаты показали, что ген возрастной устойчивости Lr22b сорта Тэтчер не эффективен против бурой ржавчины на юге Западной Сибири. Высокий уровень устойчивости показали линии TcLr12, TcLr13, TcLr22a, TcLr35 и TcLr37. В большей степени была поражена линия TcLr34, поскольку проявление гена подавляла высокая температура среды. Проявление механизмов устойчивости растений приводило к интенсивному подавлению спорогенеза гриба.

Цитологические проявления возрастной устойчивости в онтогенезе

Для определения механизмов возрастной устойчивости было исследовано влияние растений разного возраста (фазы развития проростков, выхода в трубку и колошения) на развитие *P. triticina*. Установлены характерные особенности действия устойчивых линий на развитие патогена: нарушение образования аппрессориев на устьицах; отмирание аппрессориев и подустьичных везикул; подавление развития колоний на разных стадиях развития (абортация), замедление развития колоний и пустул.

На листьях восприимчивых сортов Саратовская 29 и Тэтчер с увеличением возраста растений наблюдалось подавление образования аппрессориев в небольшой степени, других цитологических проявлений несовместимости не выявлено. На поверхности листьев линий с генами возрастной устойчивости было существенно подавлено образование аппрессориев на устьицах. На линиях TcLr13, TcLr35, TcLr37 этот эффект наблюдался на всех стадиях раз-

вития растений, причем на линиях TcLr35 и TcLr37 существенно усиливался к стадии колошения. В то же время на линиях TcLr22a и TcLr34 подавление образования аппрессориев снижалось с возрастом растения, а на линии TcLr12 проявлялось только на стадии колошения (рис. 2). Нарушение развития гриба на поверхности линий с генами возрастной устойчивости выявлено впервые, поскольку ранее изучались только особенности развития гриба в тканях.

На следующих этапах патогенеза наблюдались существенные различия взаимодействия устойчивых линий и восприимчивых сортов с патогеном. На устойчивых линиях в значительной части инфекционных мест гриб останавливался в развитии на стадиях аппрессория на устьице, подустыичной везикулы или первой инфекционной гифы. На растениях с генами Lr12 и Lr35 ингибирующее действие растений на гриб оставалось относительно стабильным на всех стадиях развития, в то же время на линиях TcLr13, TcLr22a, TcLr34 и

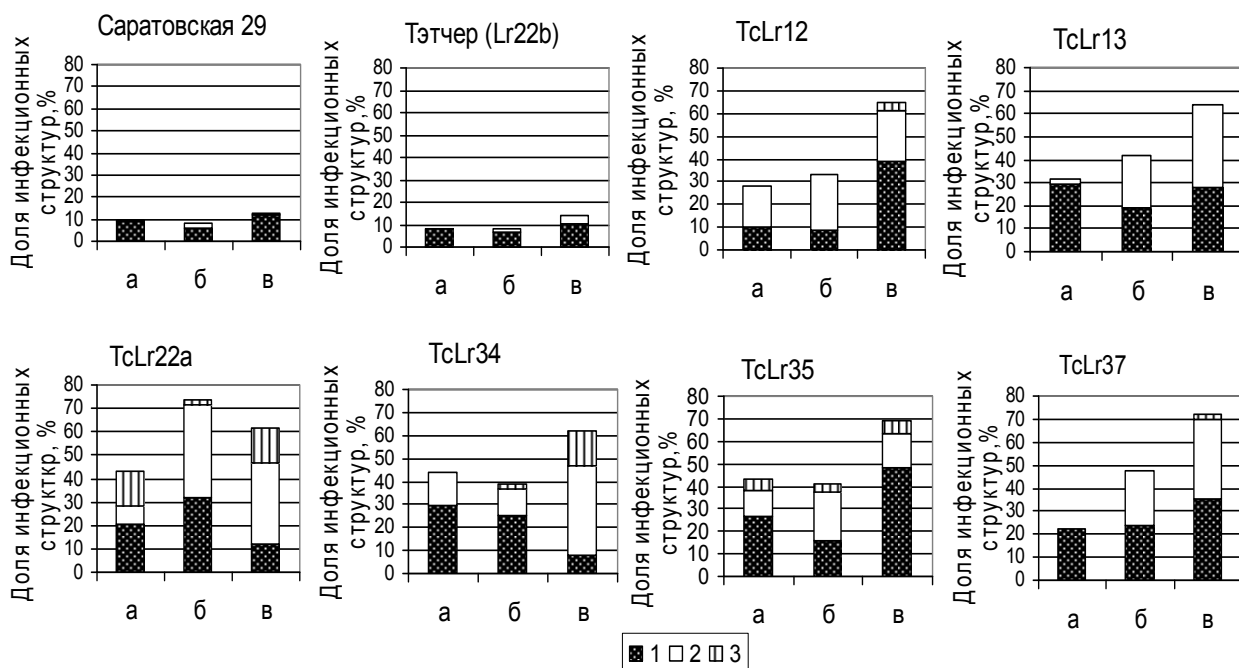


Рис. 2. Соотношение инфекционных единиц *P. triticina*, прекративших развитие на разных стадиях патогенеза на листьях сорта Тэтчер и линий с генами возрастной устойчивости (% от нанесенного инокулюма): 1 – ростковые трубки без аппрессориев или с аппрессориями на эпидермальных клетках; 2 – инфекционные единицы, остановившиеся на стадиях аппрессория на устьице, подустыичной везикулы или одной инфекционной гифы; 3 – abortивные колонии. Фазы развития растений: а – проростки, б – выход в трубку, в – колошение.

TcLr37 этот эффект усиливался с возрастом растений (рис. 2). В целом, на линиях с генами возрастной устойчивости до 70% инокулюма прекращало развитие до внедрения гаустория гриба в мезофильную клетку, т. е. проявлялась прегаусториальная устойчивость (Niks, 1983).

После внедрения в ткани влияние растений всех линий с генами возрастной устойчивости приводило к существенному нарушению формирования инфекционных структур на ранних этапах патогенеза (1-3 сутки после инокуляции). Отрицательное влияние растений на развитие инфекционных структур в ткани листьев усиливалось с возрастом растений, при этом цитологических признаков защитных реакций растений не выявлено. Подавление развития структур гриба приводило к абортации части колоний в ткани листьев линий TcLr22a, TcLr34 и TcLr35. На линии TcLr12 остановка части колоний (9%) проявлялась только на стадии колошения. После абортации колоний в их зоне наблюдалось постепенное отмирание клеток растений и утолщение их стенок.

На линиях с генами возрастной устойчивости колонии и пустулы гриба имели существенно меньший размер, чем на восприимчивых сортах. На всех линиях в зоне медленно развивающихся колоний на поздних этапах патогенеза наблюдалось постепенное разрушение части клеток растения. В результате в области пустул формировались небольшие некротические зоны. Однако типичного проявления реакции СВЧ в форме коллапса и быстрого разрушения клеток не наблюдалась.

4. Цитофизиологические механизмы возрастной устойчивости

Нами была исследована роль окислительного взрыва, синтеза каллозы и фенольных веществ в защите растений с генами возрастной устойчивости. Исследования проводили на трех стадиях развития растений: проростков, выхода в трубку, колошения. Для выявления особенностей механизмов возрастной устойчивости в эксперименты включили восприимчивую линию с геном Lr2a, проявляющимся на стадии проростков.

Для определения начала специфического взаимодействия и активации защитных механизмов важно определение момента узнавания партнеров. Нами впервые установлено, что при контакте аппрессориев с частью устьиц происходил окислительный взрыв через 12 часов после инокуляции. Генерацию супероксид-аниона определяли по накоплению красителя нитросинего тетразолия. Краситель интенсивно накапливался в цитоплазме аппрессориев и подустыичных везикул, но не замыкающих клеток устьиц, что свидетельствует об экстраклеточной генерации активных форм кислорода (рис.3, а). В результате значительная часть аппрессориев и подустыичных везикул погибала до внедрения в клетки растения. Выявлена тесная зависимость между интенсивностью окислительного взрыва на устьицах и гибелью инфекционных структур до проникновения в клетки растения. В части инфекционных мест грибок продолжал развитие, что свидетельствует о нестабильном проявлении окислительного взрыва.

Нами впервые было изучено влияние двух активных механизмов в форме синтеза защитного полисахарида каллозы (β -1,3-глюкан) и фенольных веществ на патогенез. Синтез каллозы считается высокоэффективным механизмом устойчивости. Имеющиеся в литературе данные о роли фенольных веществ в защите пшеницы от ржавчинных болезней противоречивы.

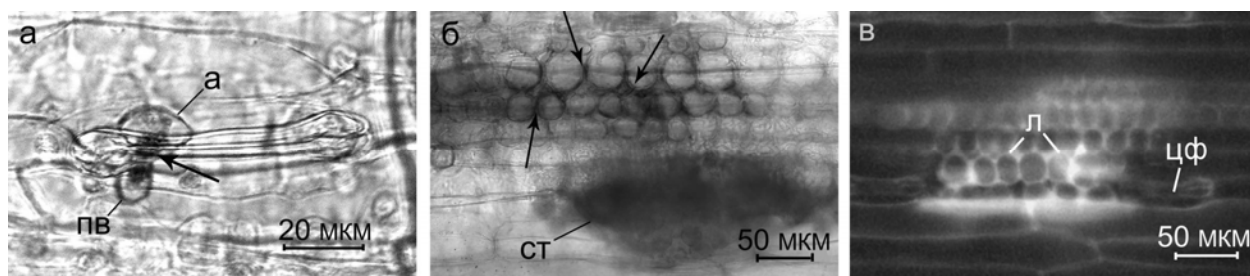


Рис. 3. Защитные реакции линий с генами возрастной устойчивости при взаимодействии с *P. triticina*. а – генерация супероксид-аниона при проникновении гриба в устьичную щель (стрелка); б – интенсивные отложения каллозы на клеточных стенках (стрелки) в зоне abortивной колонии (9 суток после инокуляции); в – интенсивные отложения лигнина в зоне abortивной колонии. Окраска: а – нитросиний тетразолий; б – кораллин; в – автофлуоресценция фенолов. Сокращения: а – аппрессорий, пв – подустыичная везикула, ст – спорогенная ткань, л – лигнин, цф – цитоплазматические фенолы.

Нами установлено, что в местах контакта стенок замыкающих клеток устьиц с погибшими аппрессориями и подустыичными везикулами появлялись отложения каллозы и лигнина (через 1 сут и 2-3 сут после инокуляции соответственно) Таким образом, при остановке гриба на этапе проникновения в ткань первичным был окислительный взрыв, а синтез каллозы и фенольных веществ происходил после остановки патогена.

Развитие колоний патогена в ткани листьев происходило с разной интенсивностью. В тканях линий TcLr22a, TcLr34, TcLr35 наблюдалась абортация колоний на ранних этапах развития через 3-5 сут после инокуляции. Для этих линий было характерно подавление развития инфекционных структур, необходимых для биотрофного питания патогена – материнских клеток гаусториев (МКГ) и гаусториев. Вероятно, нарушение формирования инфекционных структур гриба было причиной остановки развития гриба, так как защитные реакции в форме синтеза каллозы, фенольных веществ и отмирания клеток растения проявлялись после абортации колоний.

Поскольку на линиях с генами возрастной устойчивости подавление образования аппрессориев на устьицах наблюдалось до окислительного взрыва, который возникает в момент узнавания элиситоров гриба, а цитологические признаки несовместимости в зоне абортивных колоний проявлялись после остановки развития гриба, то мы считаем, что подобное воздействие растений является проявлением пассивного неспецифического механизма. Оно может быть результатом отсутствия комплекса стимулов для развития инфекционных структур гриба на поверхности и в тканях растений. Такое воздействие характерно для растений с генами устойчивости, интрогрессированными из далеких видов злаков (Плотникова, 2009).

В части инфекционных мест колонии гриба останавливались в развитии на поздних этапах патогенеза, либо образовывали пустулы небольшого размера. В зоне таких колоний через 5-9 суток после инокуляции наблюдалось усиление синтеза каллозы, фенольных веществ и постепенное отмира-

ние клеток растений. Очевидно, угнетение развития гриба являлось следствием проявления комплекса механизмов устойчивости растений.

Накопление фенольных веществ в клетках растений было изучено с помощью цитохимических методов и путем наблюдения их автофлуоресценции. С помощью окраски серноокислым анилином выявляли комплекс фенольных веществ в цитоплазме, а также отложений лигнина на клеточных стенках. Нами впервые проанализирован качественный состав фенольных веществ в тканях зараженных линий с генами возрастной устойчивости. Установлено, что соединения с остатками транскоричного альдегида появляются в зоне колоний гриба к моменту спороношения, а вещества с остатками сирингина синтезировались раньше – через 3-5 суток после инокуляции и коррелировали с проявлением устойчивости растений.

Исследование автофлуоресценции фенольных веществ в тканях инфицированных листьев растений с генами возрастной устойчивости показало два типа свечения фенольных веществ – красную автофлуоресценцию в цитоплазме клеток и апопласте, а также зеленую автофлуоресценцию отложений лигнина на клеточных стенках. Такое свечение было сходно с автофлуоресценцией лигнина в проводящих пучках здоровых участков листьев. Зеленый цвет автофлуоресценции отличался от желтого свечения лигнина в тканях линии TcLr2a, для которой была характерна реакция СВЧ. В этих же зонах с помощью хлор-сульфитной реакции установлено повышенное содержание сирингина. Таким образом, в линиях с генами возрастной устойчивости впервые показано значение специфической ветви фенольного метаболизма в подавлении развития патогена.

С возрастом растений интенсивность защитных реакций повышалась (рис. 4). Отложения каллозы на клеточных стенках растений становились более мощными, в тканях линий TcLr13, TcLr34 и TcLr37 образовывались сетчатые структуры в зоне инфекционных гиф (рис.3, б). Поскольку ранее показана взаимозависимость между генерацией активных форм кислорода и син-

тезом каллозы, то можно предполагать развитие второго окислительного взрыва в этих зонах листьев.

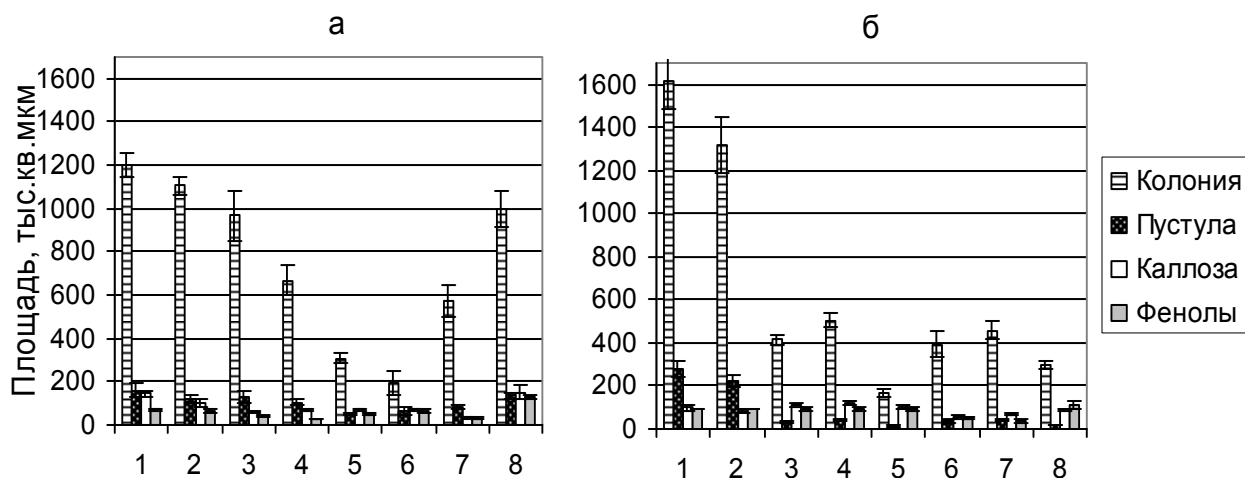


Рис. 4. Накопление каллозы и фенолов в области колоний *P. triticina*, 9 суток после инокуляции. Фазы развития растений: а – проростки, б – колошение. 1 – сорт Саратовская 29, 2 – Тэтчер (Lr22b), 3 – TcLr12, 4 – TcLr13, 5 – TcLr22a, 6 – TcLr34, 7 – TcLr35, 8 – TcLr37.

С возрастом растений усиливался синтез фенолов и лигнификация клеточных стенок. На стадии проростков лигниновые отложения были представлены в виде тонкой сетки, а на стадии колошения отложения были мощными, часто имели форму сетки в зоне контакта с инфекционными гифами (рис. 3, в). Поскольку лигниновые отложения наблюдались только в центре колоний на поздних этапах патогенеза, то лигнификация не могла быть причиной замедления распространения мицелия гриба. Вероятно, основное фунгицидное действие имели предшественники лигнина, накапливавшиеся в цитоплазме и апопласте.

На листьях линий TcLr22a и TcLr37 активные реакции растений проявлялись в большей части зоны колонии, одновременно рост мицелия интенсивно подавлялся. Вероятно, эти механизмы имели значение в сдерживании роста колоний. На остальных линиях синтез каллозы и фенолов был сосредоточен в центральной части колоний, хотя развитие колоний было существенно подавлено (рис. 4). Поэтому можно предположить влияние дополнительных защитных механизмов, в частности, синтеза защитных PR – белков. Сигналом для развития SAR может быть окислительный взрыв на части

устьиц. Это предположение подтверждается тем, что интенсивность окислительного взрыва на устьицах линий TcLr13, TcLr34, TcLr37 повышалась с возрастом растений, одновременно усиливалось угнетение развития гриба в ткани растения.

5. Роль индуцированной устойчивости в возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине

Известна гипотеза о том, что неспецифическая устойчивость сортов в агроценозах может быть связана с формированием системной приобретенной устойчивости растений (SAR) при контакте с авирулентными микроорганизмами (Metraux, 2001; Tuzun, 2001). Однако доказательства гипотезы отсутствуют. Для проверки гипотезы нами впервые был проведен комплекс полевых и лабораторных исследований с использованием в качестве биоиндуктора инокулюма, полученного размножением популяции непатогенного для пшеницы гриба *P. coronata*. Одновременно с этим возможность развития SAR была проверена в экспериментах с химическими индукторами с известными механизмами действия. Янтарная и арахидоновая кислота являются индукторами окислительного взрыва, Бион – синтез PR-белков.

Результаты полевых и лабораторных экспериментов показали, что предварительный контакт растений с биоиндуктором (иммунизация) привел к повышению устойчивости растений. Эффект иммунизации был, как правило, более сильным на линиях с генами возрастной устойчивости, чем на восприимчивых сортах Саратовская 29 и Тэтчер и линии TcLr2a. Исключение составили опыты с линиями TcLr13 и TcLr34 в полевых условиях. Возможной причиной отклонений в результатах экспериментов было подавление действия генов высокой температурой среды.

В лабораторных условиях изучали проявление SAR в 3-х зонах растений: на нижней половине листа в месте нанесения *P. coronata*, на верхней интактной половине того же листа и на верхнем незараженном листе. Линии с генами возрастной устойчивости отличались особенностями проявления ин-

дуцированной устойчивости. На линиях TcLr12, TcLr34, TcLr35 эффект проявлялся только в месте нанесения биоиндуктора. На линии TcLr22a наблюдалась индукция SAR на целом листе, включая обработанные и необработанные индуктором части. На линиях TcLr13 и TcLr37 дополнительно выявлено проявление SAR на верхних интактных листьях растений. Это свидетельствует о генетически обусловленных особенностях распространения сигнала для развития SAR в организме растений.

Наши данные, полученные с помощью химических индукторов, подтвердили возможность влияния SAR на проявление бурой ржавчины. Выявлено разное влияние индукторов на линии, защищенные различными генами устойчивости. Наиболее эффективным оказалось применение Биона – индуктора синтеза PR-белков, менее эффективными были обработки индукторами окислительного взрыва – арахидоновой и янтарной кислотой. Это подтверждает наше предположение о роли PR-белков в формировании возрастной устойчивости пшеницы. Вероятно, отзывчивость на обработку разными индукторами отражает генетическую предрасположенность растений к активации разных метаболических путей.

Для выявления особенностей биотической индукции были проведены цитофизиологические исследования реакций растений. Особое внимание уделяли влиянию SAR на ранее выявленные механизмы возрастной устойчивости. Исследования показали, что только на листьях линии TcLr35 наблюдалось подавление образования аппрессориев на устьицах, на остальных линиях влияния SAR на развитие поверхностных структур гриба не отмечено. На линии TcLr13 отмечено существенное (на 25%) повышение гибели инокулюма гриба на этапе внедрения в устьица за счет усиления окислительного взрыва. Общим проявлением устойчивости на всех линиях было увеличение доли abortивных колоний. Наибольший эффект наблюдался на линии TcLr35, на ее листьях иммунизация *P. coronata* приводила к абортации 95% колоний на ранних этапах патогенеза. На листьях всех линий развивающиеся колонии были меньше по площади в сравнении с контролем, в них наблюда-

лось существенное подавление формирования инфекционных структур. В зоне колоний был усилен синтез каллозы и фенольных веществ.

Таким образом, наши эксперименты показали, что биондукция приводит к усилению разных механизмов возрастной устойчивости: подавлению развития инфекционных структур гриба на поверхности и в тканях, усилению окислительного взрыва на устьицах и синтеза каллозы и фенолов. Этот эффект может играть существенную роль в защите растений от болезни в агроценозах. Полученные данные также подтверждают роль SAR в формировании возрастной устойчивости растений.

6. Механизмы устойчивости межлинейных гибридов

Для защиты растений считается перспективным создание растений с набором эффективных генов и комплексом механизмов устойчивости. Нами изучены механизмы устойчивости гибридов, полученных в результате скрещивания линий с генами возрастной устойчивости. Оценка развития ржавчины на гибридах F_1 в полевых и лабораторных условиях показала, что их устойчивость была выше по сравнению с восприимчивыми сортами Саратовская 29 и Тэтчер.

Мы предположили, что в результате скрещивания линий при сочетании одинаковых механизмов устойчивость гибридов F_1 не должна усиливаться, а различных механизмов – будет повышаться. Цитологические исследования показали, что общее повышение устойчивости гибридов обеспечивалось усилением разных механизмов защиты (рис. 5). На растениях гибридов с комбинациями генов TcLr34xTcLr13 и TcLr34xTcLr12 было существенно подавлено формирование аппрессориев на устьицах, но не наблюдалось усиления гибели патогена при внедрении в устьица, а в части комбинаций проникновение гриба усиливалось. Это свидетельствует о том, что усиления окислительного взрыва на устьицах в гибридах не происходило.

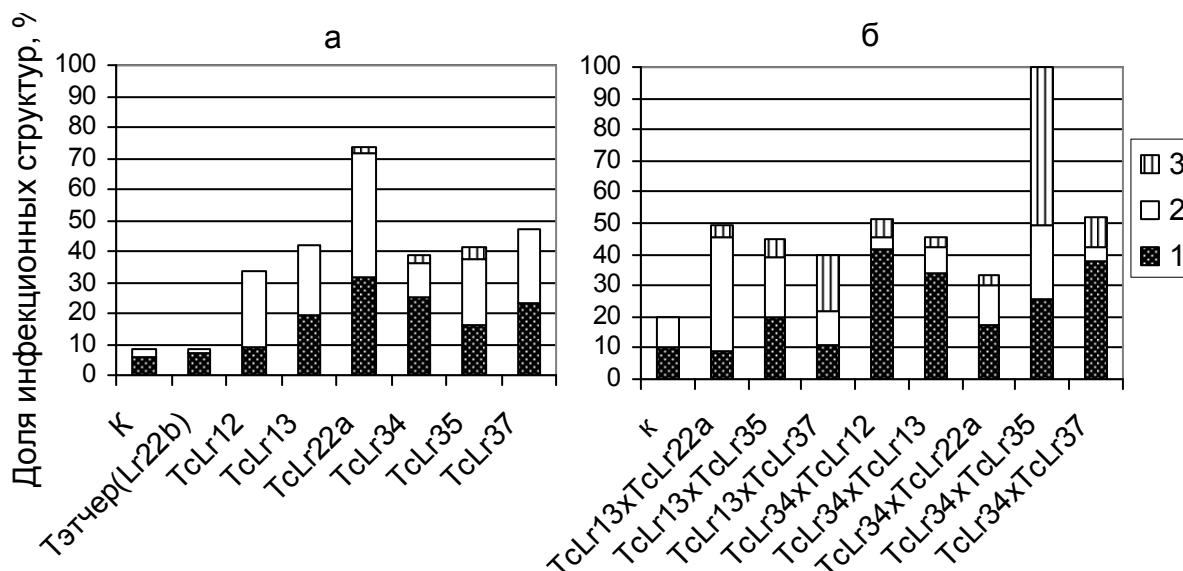


Рис. 5. Соотношение инфекционных единиц *P. triticina*, прекративших развитие на разных стадиях патогенеза: а - на растениях родительских линий сорта Тэтчер; б – на гибридных растениях (% от нанесенного инокулюма); 1 – ростковые трубки без аппрессориев или с аппрессориями на эпидермальных клетках; 2 – инфекционные единицы, остановившиеся на стадиях аппрессория на устьице, подустыичной везикулы или одной инфекционной гифы; 3 – abortивные колонии.

Для действия большинства гибридных растений (за исключением TcLr34xTcLr13 и TcLr34xTcLr22a) было характерно усиление абортации колоний в ткани растений в сравнении с родительскими линиями. При этом в растениях гибридов TcLr13xTcLr22a, TcLr34xTcLr13, TcLr34xTcLr35, TcLr34xTcLr37 абортация была связана с нарушением формирования инфекционных структур в ткани растений. Особенностью реакции гибрида TcLr34xTcLr37 было проявление реакции СВЧ при остановке развития гриба. В тканях всех гибридов в зоне развивающихся и abortивных колоний усиливался синтез каллозы и фенольных веществ, а также лигнификация клеточных стенок.

Таким образом, нами впервые показано, что взаимодействие генов устойчивости может приводить как к усилению, так и подавлению отдельных механизмов защиты. Эти результаты необходимо учитывать при создании сортов с комплексом механизмов устойчивости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования выявили цитофизиологические механизмы возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине и формирование их в процессе онтогенеза. Полученная информация представляет интерес для развития теории иммунитета растений, а также важна для селекции сортов с длительной устойчивостью к бурой ржавчине.

ВЫВОДЫ

1. Устойчивость *Triticum aestivum* L. к *Puccinia triticina* Erikss. на юге Западной Сибири (г. Омск) обеспечивают гены возрастной устойчивости Lr12, Lr13, Lr22a, Lr34, Lr35, Lr37. Ген Lr22b в генотипе сорта Тэтчер в Западной Сибири не эффективен. Действие генов устойчивости Lr34 и Lr13 существенно зависит от температуры, а эффект гена Lr37 не зависел от условий среды.

2. Выявлены характерные особенности нарушения развития изолятов *P. triticina*, приводящие к неспецифической защите линий с генами возрастной устойчивости: подавление образования аппрессориев на устьицах и инфекционных структур в тканях, отмирание части инокулюма при внедрении в устьица, отмирание части колоний; ограничение роста мицелия и спорогенеза гриба.

3. Резистентность к бурой ржавчине повышалась с возрастом растений, при этом у разных линий усиливались разные механизмы устойчивости.

4. Выявлена экстраклеточная генерация активных форм кислорода замыкающими клетками устьиц при контакте с частью аппрессориев, приводящая к остановке проникновения гриба в ткани.

5. Накопление защитного полисахарида каллозы (β -1,3-глюкан) на клеточных стенках происходило на поздних этапах патогенеза и было одним из механизмов ограничения развития колоний и пустул гриба. Синтез каллозы усиливался с возрастом растений.

6. Синтез фенольных веществ в цитоплазме растений и лигнификация клеточных стенок происходили на поздних этапах патогенеза и усиливались с возрастом растений. Впервые установлено, что фенольные соединения обогащены сирингином и имели зеленый цвет автофлуоресценции, отличный от наблюдавшегося в растениях с проявлением реакции СВЧ.

7. Доказана роль системной приобретенной устойчивости, индуцированной биоиндукторами, в защите линий с генами возрастной устойчивости. Продемонстрированы различия в наборе индуцированных механизмов устойчивости разных линий.

8. На примере межлинейных гибридов F_1 с генами возрастной устойчивости показано, что взаимодействие генов может приводить как к усилению, так и подавлению отдельных механизмов устойчивости растений: окислительного взрыва, синтеза каллозы и фенолов, реакции СВЧ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Плотникова Л.Я., Кнауэ Ю.К., **Штубей Т.Ю.** Цитологические механизмы проявления действия перспективных генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине // Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и образования: сб. тр. II Междунар. науч.-практ. конф. – Самара, 2005 – С. 237–240.

2. Плотникова Л.Я., **Штубей Т.Ю.** Механизмы действия генов возрастной устойчивости мягкой пшеницы к бурой ржавчине и перспективы их использования в селекции // Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве, растениеводстве и экономике: Сборник трудов региональной науч.-практ. конференции. – Томск, 2005. – Выпуск 8, с. 244-247.

3. Плотникова Л.Я., Шаманин В.П., **Штубей Т.Ю.** Изучение цитофизиологических аспектов проявления генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине // Фитосанитарное оздоровление агроэкосистем: материалы II Всерос. съезда по защите растений (С-Петербург 5–10 декабря 2005 г.). – СПб., 2005. – С. 540–542.

4. **Штубей Т.Ю.**, Плотникова Л.Я. Изучение особенностей проявления генов возрастной устойчивости мягкой пшеницы к бурой ржавчине в условиях Западной Сибири // Современные тенденции развития аграрной науки Сибири: материалы IV Междунар. научн.-практ. конф. молодых ученых, посвящ. 70-летию НГАУ (Новосибирск, 28–30 марта 2006 г.). – Новосибирск, 2006. – С. 91–94.

5. Плотникова Л.Я., Алексеева О.А., **Штубей Т.Ю.** Эффективные сочетания генов устойчивости для защиты пшеницы от бурой ржавчины в Западной Сибири // Материалы конференции, посвященной 119-летию Н.И. Вавилова «Вавиловские чтения – 2006» (Саратов, 4 – 8 декабря 2006г.). – Саратов, 2006. – с.45-48.

6. Плотникова Л.Я., **Штубей Т.Ю.** Роль биоиндукции в возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине // Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК»: сб. материалов Междунар. конф. (Москва, 29–30 мая 2007 г.). – М., 2007. – Ч.1. – С.105–108.

7. **Штубей Т.Ю.**, Плотникова Л.Я. Биоиндукция как механизм действия генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине // Материалы междунар. конф. «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства» (Москва, 27–28 ноября 2007 г.) / ФГОУ ВПО РГАУ– МСХА им. К.А. Тимирязева. – М., 2007. – С. 188–189.

8. Плотникова Л.Я., **Штубей Т.Ю.** Индуцированная устойчивость как фактор «медленного ржавления» пшеницы при поражении бурой ржавчиной // Материалы II Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (С-Петербург, 29 сентября – 2 октября 2008 г.). – СПб., 2008. – С. 265–268.

9. Плотникова Л.Я., **Штубей Т.Ю.** Эффективность генов возрастной устойчивости к бурой ржавчине пшеницы Lr12, Lr22a, Lr34 и механизмы их действия // Материалы XIII Всерос. научно-практической конф. «Селекция и

семеноводство сельскохозяйственных культур» (Пенза, февраль 2009 г.). Пенза, 2009. – С. 95-99.

10. Плотникова Л.Я., **Штубей Т. Ю.** Влияние салициловой и янтарной кислот на цитофизиологические реакции пшеницы, инфицированной бурой ржавчиной // Цитология. – 2009. – Т. 51. – №1. – С. 41–50.

11. Плотникова Л.Я., **Штубей Т. Ю.** Фенотипическое и цитологическое проявление возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине, детерминированное генами Lr13, Lr22b и Lr35 // Микология и фитопатология. – 2009. – Т.43. - №3. – С. 258–271.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю доценту канд. биол. наук Л.Я. Плотниковой за помощь в подготовке диссертации, а также благодарит заведующего лабораторией иммунитета СибНИИСХ канд. биол. наук Л.В. Мешкову за предоставление материала для исследований. Автор благодарит сотрудников кафедры селекции, генетики и физиологии растений и лаборатории селекции мягкой пшеницы и тритикале ОмГАУ за помощь в выполнении диссертационной работы.