

Олег Родославович Александрович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии Поморской академии (г. Слупск, Польша).

Олег Всеволодович Морозов – доктор биологических наук, декан лесохозяйственного факультета Белорусского государственного технологического университета.

УДК 633.16:632.488:631.526.32:581.19

Ю. И. КОЖУРО, Е. А. СЕМЕНЧИК, Н. П. МАКСИМОВА

СОРТОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ СТРЕСС-РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ВЫЗВАННОЙ ВОЗБУДИТЕЛЕМ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ ИЗ РОДА *FUSARIUM*

Peculiarities of stress in barley *Hordeum vulgare* L. induced by root rot *Fusarium* sp. were specify for Belarusian varieties Gonar, Dzyvosny and Staly. Stress reaction was assessed by change in length of plants roots, as well by changes in peroxidase activity, lipid peroxidation level and reduced glutathione content in root cells. This is evidenced not only morphometric, and biochemical parameters studied. It was demonstrate that Staly's plants possess the lower sensitivity to pathogen impact. Their antioxidant system characterized by the absence of peroxidase enzymes induction, higher reduced glutathione and lower lipid peroxidation levels in cells in compare with Gonar's and Dzyvosny's plants. Mentioned above peculiarities of barley varieties response can be use for artificial selection of plant forms resistant to biotic stress agents. Established features of response of plants can be used for the selection of forms resistant to biotic stress factors.

Ключевые слова: ячмень, устойчивость к фузариозу, антиоксидантная система, пероксидазная активность, перекисное окисление липидов.

Key words: barley, resistance to fusariosis, antioxidant system, peroxidase activity, lipid peroxidation.

Согласно имеющимся в настоящее время данным, устойчивость растительных организмов к разнообразным воздействиям во многом определяется состоянием их окислительно-восстановительной системы [1]. Накопленный материал свидетельствует, что устойчивые формы растений обладают более высоким содержанием антиоксидантных ферментов и других соединений, прерывающих цепные окислительные реакции [2, 3]. Одним из основных свойств растений является их способность к индукции активности антиоксидативного комплекса [4, 5]. В некоторых случаях в результате такой индукции растения приобретают устойчивость не только к фитопатогену, но и к другим стрессовым факторам [6].

Одним из ответов растительных клеток на негативное воздействие окружающей среды выступает окислительный стресс как часть общего ответа растений на проникновение инфекции [7]. Суть его заключается в том, что индукция активных форм кислорода (АФК) вызывает гибель клеток растений, препятствуя распространению патогена. Имеются данные, что АФК являются триггерными молекулами, которые регулируют активность ферментов и вызывают изменения в экспрессии ряда генов [8]. Изучение этих процессов даст важную информацию об адаптивных реакциях растительных клеток и позволит приблизиться к расшифровке механизмов многих физиологических процессов. Установление конкретных характеристик антиоксидантной системы у различных видов и сортов растений может послужить основанием для проведения поиска и получения форм, устойчивых к действию негативных биотических и абиотических факторов.

Цель настоящей работы – выяснение особенностей стресс-реакции ячменя *Hordeum vulgare* L. сортов Гонар, Дзивосны и Сталы при воздействии возбудителя корневой гнили из рода *Fusarium*. Реакцию растений оценивали с помощью морфометрического (средняя длина корней) и биохимических (изменение пероксидазной активности, уровень перекисного окисления липидов, содержание восстановленной формы глутатиона в клетках корневой системы) параметров.

Материал и методика

Объектом исследования являлись проростки ячменя. Семена растений проращивали в течение 48, 72 и 96 ч в чашках Петри на двух слоях фильтровальной бумаги при 25 °С. Обработку растений в течение всего срока прорастания проводили 25 % фильтратом культуральной жидкости (ФКЖ) изолята патогена, выращиваемого на жидкой картофельной среде в течение 5 сут [9]. Изолят гриба был получен из инфицированных сортообразцов ячменя, собранных в окрестностях д. Щомыслица Минского р-на, и отобран по результатам теста на гиперчувствительность на растениях табака настоящего *Nicotiana tabacum* L. В контрольных экспериментах использовали проростки растений, выращенные на 25 % жидкой картофельной питательной среде.

Для определения активности пероксидаз гваялового типа кончики корешков длиной 10 мм растирали на холоде в ацетатном буфере (рН 5,4). Вытяжку настаивали 10 мин, после чего центрифуги-

ровали в течение 10 мин при 13 000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для определения ферментативной активности пероксидаз по методу Бояркина [10]. В качестве хромогенного субстрата использовали бензидин. Оптическую плотность экстрактов пероксидазы измеряли с помощью спектрофотометра Cary 50 (Австралия) при длине волны 540 нм. Уровень ПОЛ в клетках определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты по количеству конечного продукта реакции – малонового диальдегида (МДА) [11]. Содержание восстановленного глутатиона определяли с помощью дитионитробензойной кислоты по методу Элмана [12], белка в образцах – по методу Бредфорда [13].

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с помощью программ Excel 2003 и Statistica 6.0 с расчетом выборочной средней и стандартной ошибки среднего. После оценки параметричности выборок с помощью критерия Колмогорова – Смирнова использовали *t*-критерий Стьюдента для попарных сравнений или критерий Уилкоксона.

Результаты и их обсуждение

Для оценки общей фитотоксичности выделенного штамма *Fusarium* sp. в отношении изучаемых сортов ячменя был проведен анализ морфометрических показателей корневой системы проростков. Установлено, что в присутствии патогена наблюдается замедление роста ячменя сортов Гонар и Дзивосны (рис. 1). Средняя длина корней этих растений, выращиваемых на среде с 25 % ФКЖ патогена в течение 72 и 96 ч, отличается от контроля в 1,4÷1,6 раза ($p > 0,05$) и 1,9÷2,0 раза ($p < 0,05$) соответственно, в то время как динамика роста корневой системы ячменя сорта Сталы свидетельствует о ее устойчивости к использованному в работе штамму *Fusarium* sp.

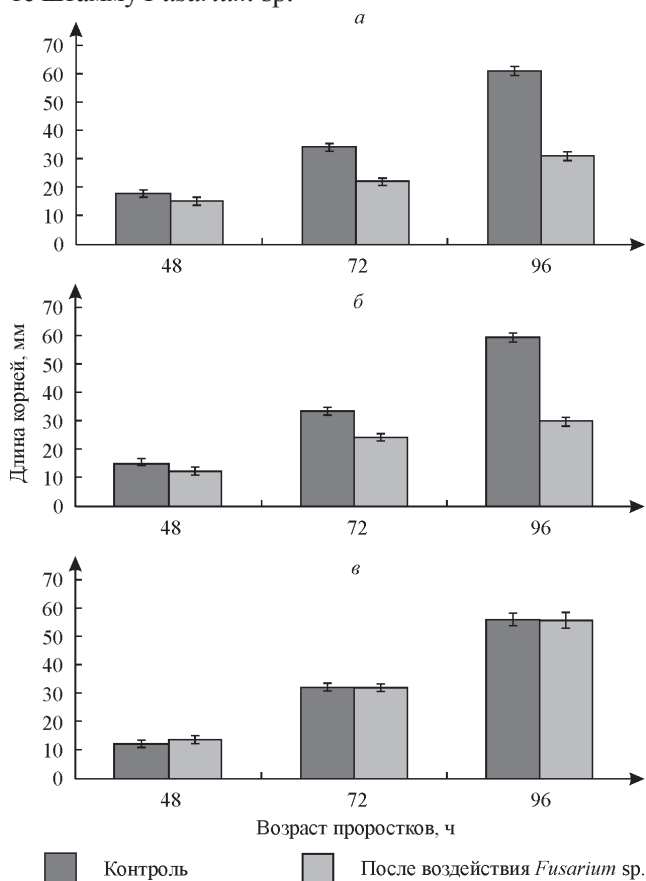


Рис. 1. Морфометрические показатели корневой системы ячменя сортов Гонар (а), Дзивосны (б) и Сталы (в)

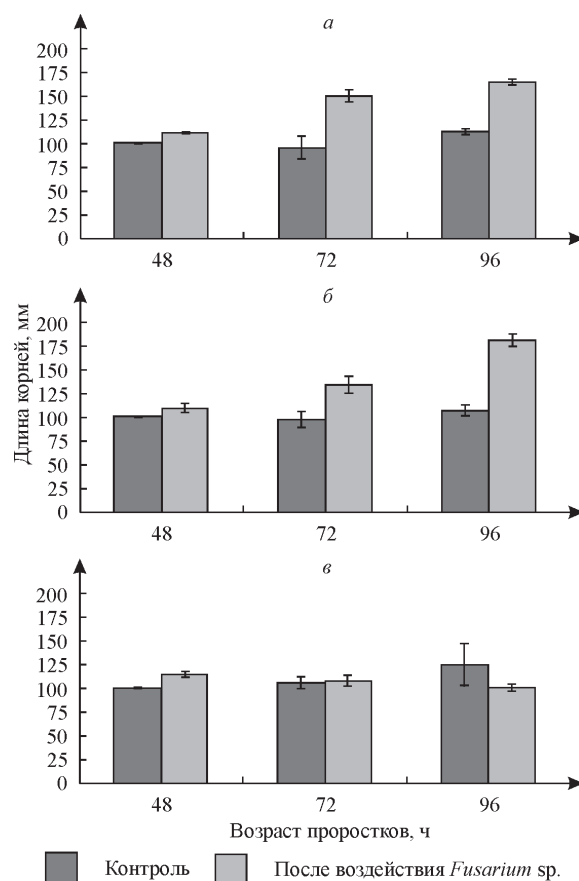


Рис. 2. Пероксидазная активность в клетках корней ячменя сортов Гонар (а), Дзивосны (б) и Сталы (в)

При обработке растений ячменя сорта Гонар ФКЖ патогена наблюдалось изменение активности ферментов пероксидазного комплекса (рис. 2 а). Так, у 2-, а также у 3- и 4-суточных проростков происходило увеличение пероксидазной активности в 1,1, 1,6 и 1,5 раза соответственно. Проведенный статистический анализ для независимых выборок показал, что изменение данного параметра в клетках проростков, выращенных на среде с патогеном в течение 72 и 96 ч, достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$). Аналогичные результаты получены и для растений сорта Дзивосны (рис. 2 б).

У проростков ячменя сорта Сталы статистически значимого изменения пероксидазной активности при росте на среде с ФКЖ патогена не зарегистрировано (рис. 2 в).

Содержание МДА в клетках корней ячменя, выращенных в присутствии ФКЖ *Fusarium* sp.

Возраст проростков, ч	Содержание МДА, ммоль/мг белка	
	Контроль	ФКЖ <i>Fusarium</i> sp.
Сорт Гонар		
48	1,31±0,14	1,63±0,06
72	1,68±0,06	2,37±0,10
96	1,59±0,20	2,67±0,49*
Сорт Дзивосны		
48	1,71±0,01	1,99±0,01
72	2,75±0,01	3,95±0,04
96	3,29±0,02	5,26±0,04
Сорт Сталы		
48	1,82±0,01	1,40±0,01
72	2,40±0,01	2,22±0,01
96	3,45±0,02	3,31±0,02

Примечание. *Разница с контролем статистически достоверна при $p < 0,05$.

Одним из возможных компонентов быстрой реакции организма на стресс является активация ПОЛ [14]. Данные табл. 1 свидетельствуют, что уровень МДА в клетках корней проростков ячменя сорта Гонар, обработанных 25 % ФКЖ *Fusarium* sp., на 2-е сут практически не изменился и соответствовал контрольному значению. Однако на 3-и и 4-е сут количество продуктов ПОЛ в клетках было выше, чем в контроле. Так, на 3-и сут уровень МДА по сравнению с контролем увеличился в 1,4 раза ($p > 0,05$), а на 4-е – в 1,7 раза ($p \leq 0,05$). Количество МДА в клетках корней проростков ячменя сорта Дзивосны, обработанных 25 % ФКЖ *Fusarium* sp., на 2-е сут соответствовало контрольному параметру, а на 3-и и 4-е увеличивалось в 1,4 и 1,6 раза соответственно. Статистический анализ данных показал, что зарегистрированные изменения уровня ПОЛ находились в пределах ошибки выборки ($p > 0,05$).

Содержание МДА у проростков ячменя сорта Сталы при обработке 25 % ФКЖ патогена осталось практически на том же уровне. Зарегистрированное изменение данного параметра находилось в пределах ошибки выборки ($p > 0,05$).

Известно, что устойчивость растений к неблагоприятным внешним воздействиям коррелирует с уровнем глутатиона – низкомолекулярного тиолового соединения [15]. Нами показано, что в условиях индуцированного окислительного стресса значительного изменения уровня восстановленной формы глутатиона у проростков сортов Гонар и Дзивосны не установлено (табл. 2). Количество глутатиона в клетках корней проростков ячменя сорта Сталы, обработанных 25 % ФКЖ патогена, на 2-е сут соответствовало контрольному параметру, а на 3-и и 4-е сут наблюдалась тенденция к его увеличению. Проведенный статистический анализ данных показал, что зарегистрированные изменения изучаемого параметра находились в пределах ошибки выборки.

Таблица 2

Содержание глутатиона в клетках корней ячменя, выращенных в присутствии ФКЖ *Fusarium* sp.

Возраст проростков, ч	Содержание глутатиона, нмоль/мг белка	
	Контроль	ФКЖ <i>Fusarium</i> sp.
Сорт Гонар		
48	25,62±3,46	21,39±2,43
72	21,98±2,06	21,24±2,36
96	22,43±1,33	22,54±2,16
Сорт Дзивосны		
48	21,35±2,10	32,24±2,32
72	23,35±2,73	24,39±3,06
96	29,44±3,88	29,68±3,77
Сорт Сталы		
48	64,09±2,79	73,09±12,43
72	66,65±3,84	88,99±5,11
96	62,44±5,61	90,11±4,50

Следует отметить, что концентрация восстановленной формы глутатиона у различных сортов варьировала в значительной степени. У растений сорта Сталы она фактически в 3 раза превышала таковой показатель сортов Гонар и Дзивосны.

Состояние антиоксидантной системы у обследованных форм ячменя показывает, что устойчивые растения по сравнению с восприимчивыми характеризуются невысокой индукцией активности анти-

оксидантного компонента на фоне менее выраженных общих повреждений. При воздействии ФКЖ *Fusarium* sp. на растения ячменя сортов Гонар и Дзівосны наблюдается индукция активности ферментов пероксидазного комплекса в клетках корневой системы. У растений сорта Сталы изменений пероксидазной активности не зарегистрировано. Отсутствие индукции пероксидазной активности в условиях воздействия стрессового фактора свидетельствует о повышенной устойчивости этого сорта к неблагоприятным условиям, показателями чего являются также меньший уровень ПОЛ и более высокое внутриклеточное содержание восстановленной формы глутатиона.

Установленные особенности ответной реакции растений ячменя *Hordeum vulgare* L. сортов Гонар, Дзівосны и Сталы при воздействии возбудителя корневой гнили из рода *Fusarium* sp. могут послужить основой для разработки подходов направленной селекции устойчивых к действию биотических стрессовых факторов форм растений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Vaughn K. C., Lehnert L. P. // Weed. Sci. 1991. Vol. 39. P. 450.
2. Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. // Plant Cell. Envir. 2003. Vol. 26. P. 845.
3. Wu F., Zhang G., Dominy P. // Environ. Exp. Bot. 2003. Vol. 50. P. 67.
4. Kaminska-Roiek E., Pukacki P. // Acta Physiol. Plant. 2004. Vol. 26. P. 431.
5. Kuzniak E., Sklodowska M. // J. Exp. Bot. 2004. Vol. 55. P. 605.
6. Gao X., Ren Z., Zhao Y., Zhang H. // Plant Physiol. 2003. Vol. 133. P. 1873.
7. Wojtaszek P. // Biochem. J. 1997. Vol. 322. P. 681.
8. Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 2940.
9. Овсянкина А. В. // Защита и карантин растений. 2004. № 8. С. 43.
10. Бояркин А. Н. // Биохимия. 1961. Т. 16. № 2. С. 252.
11. Ohkawa H., Ohish N., Yagi K. // Anal. Biochem. 1979. Vol. 95. P. 351.
12. Ellman G. L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. Vol. 82. P. 70.
13. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248.
14. Барабой В. А. // Успехи совр. биол. 1991. Т. 111. Вып. 6. С. 923.
15. Vanacker H., Carver T. L. W., Foyer C. H. // Plant Physiol. 1998. Vol. 117. P. 1103.

Поступила в редакцию 08.10.12.

Юрий Иосифович Кожуро – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.

Евгения Анатольевна Семенчик – аспирант кафедры генетики. Научный руководитель – Н. П. Максимова.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой генетики.

УДК 579.64

Е. И. КОМАР, А. Г. ПЕСНЯКЕВИЧ

ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГНИЛЕЙ КАРТОФЕЛЯ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

68 samples of various cultivars of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) were under research. 275 bacterial strains were isolated from the soft rot tubers and macerated green stems collected in 2011–2012 years. The following criteria were applied to the bacteria isolates to distinguish pathogenic isolates from saprotrophic ones for further research: ability to cause rot of plant tissue, ability to cause reaction of hypersensitivity on *Vicia faba* leaves, ability to degradation of pectin substances, ability to hydrolyze of carboxymethylcellulose and proteins of milk. This resulted in a set of 70 bacteria isolates. These isolates were divided into 4 groups (with sub-groups) based on their morphological, physiological and biochemical characteristics. Bacteria of *Pectobacterium* genus (which traditionally considered as a cause of soft rot of potato in Belarus area) is the most spread pathogens nowadays. We found also that the cause of soft rot of potato in Belarus are gram-positive bacteria, similar to the *Bacillus pumilus* species according to physiological and biochemical tests and morphological characteristic, and the fluorescent pseudomonades.

Ключевые слова: картофель, хранение, мягкая гниль, фитопатогенные бактерии, *Bacillus pumilus*, флуоресцирующие псевдомонады, *Pectobacterium*.

Key words: potato, storage, soft rot, phytopathogenic bacteria, *Bacillus pumilus*, fluorescent pseudomonades, *Pectobacterium*.

Одной из основных культур в сельскохозяйственном производстве Беларуси является картофель. Повышение продуктивности картофелеводства в стране должно осуществляться комплексно и базироваться на использовании новых сортов, применении современных агротехнических приемов и совершенствовании мер защиты вегетирующих растений и собранного урожая от патогенов [1]. В последнее десятилетие отмечаются определенные положительные сдвиги в реализации первых двух направлений, однако проблема потерь урожая картофеля из-за распространения гнилей различной этиологии