

## ИЗМЕНЕНИЯ В МЕТАБОЛИЗМЕ ПЕРСИКОВ И НЕКТАРИНОВ ПРИ ИХ ИНОКУЛЯЦИИ МУЧНИСТОЙ РОСОЙ И ОБРАБОТКЕ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛОМ

Т. Б. ГУБАНОВА, кандидат биологических наук; А.И. ЛИЦУК, доктор биологических наук; Г.В. ОВЧАРЕНКО, кандидат сельскохозяйственных наук

За последние годы достигнут определенный прогресс в изучении механизмов устойчивости растений к инфекционным болезням и неблагоприятным факторам среды. Согласно современным представлениям, иммунитет растений – это система защитных реакций, направленных не только против возбудителей инфекционных болезней, но и против всего чужеродного, проникающего в организм извне и возникающего в нем самом [14].

Анализ литературы, посвященной вопросам устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды и инфекционным болезням, позволил сделать вывод, о том, что в растительном организме кроме строго специфических систем защиты от фитопатогенов, появившихся как результат коэволюции растения-хозяина и паразита, существуют также неспецифические защитные системы, действующие на всех уровнях организации растения, чем достигается сохранение его внутреннего постоянства и функциональной целостности. Такие механизмы могут проявляться как активные ответные реакции, либо функционировать в качестве пассивных или конституциональных защитных систем, обусловленных видовыми или индивидуальными особенностями растения. Конституциональную устойчивость обуславливают особенности структурной организации клеточных стенок и мембран, цитоплазмы, химического состава тканей и их анатомического строения [7]. В частности, особенности химического состава растения могут определять его пригодность в качестве питательной среды для развития патогена, что особенно важно при изучении устойчивости к биотрофам.

Исследованиями Ю.А. Волчкова, Т.И. Исачкиной [5] установлена прямая зависимость устойчивости персиков к мучнистой росе и клостероспориозу от толщины кутикулы и количества железок с нижней стороны листа. Эти же анатомические особенности являются показателями ксероморфности и, следовательно, характеризуют степень устойчивости к обезвоживанию. Четко выраженные анатомические и морфологические различия, связанные с устойчивостью, наблюдаются в основном у генетически отдаленных видов. У близкородственных видов или сортов культурных растений одного вида не всегда удается выделить морфологические особенности, которые отличают устойчивую к стрессу форму, от неустойчивой [10]. Таким образом, при изучении механизмов устойчивости близкородственных растительных форм особую актуальность приобретает определение связанных с ней физиолого-биохимических характеристик, поскольку именно они в силу своей высокой по сравнению с анатомическими структурами мобильностью, определяют индивидуальные адаптивные возможности растения.

Еще одним существенным моментом при изучении устойчивости растений к болезням является зависимость нормального функционирования систем защиты от условий внешней среды. Изучение характера развития эпифитотий в различные годы показывает, что массовое поражение персиков мучнистой росой приходится на засушливый период. Есть данные, свидетельствующие о том, что сильные зимние морозы и холодная затяжная весна предшествуют эпифитотиям парши на яблоне [12]. По Ван дер Планку [4], взаимодействия хозяина, патогена и среды составляют

равносторонний треугольник, а скорость проникновения инфекции есть суммарный показатель генетической устойчивости хозяина, агрессивности патогена (инфекционной нагрузки), количества осадков, относительной влажности и температуры воздуха и всех других факторов любого происхождения. В этом отношении интересны исследования Л. А. Ищенко и М. В. Горленко [8], проведенные на сортах яблони с различной степенью устойчивости к парше. Ими установлено, что при заражении сеянцев яблони возбудителем парши в условиях оптимальных температур происходит четкое разделение сортов по степени устойчивости и типу реакции на инфицирование. При действии низких температур устойчивые и среднеустойчивые сорта поражаются с такой же интенсивностью, что и сильно восприимчивые. Исходя из выше изложенных фактов, можно заключить, что абиотический стресс в значительной мере снижает устойчивость растения к инфекционным болезням, вероятно, вызывая нарушения в функционировании иммунных систем. Следовательно, можно предположить, что те растения, которые обладают способностью переносить действие неблагоприятных факторов абиотического происхождения без развития выраженных аномалий, смогут сохранить имеющийся уровень устойчивости к фитопатогенам даже в условиях, способствующих возникновению эпифитотий. Выявление таких растительных форм и изучение их физиологических характеристик должно стать доминирующей задачей на современном этапе познания защитных механизмов растений. С целью проверки высказанных предположений нами были изучены некоторые физиологические характеристики, обычно используемые при определении засухоустойчивости (осмотический и водный потенциалы) видов, сортов и форм персиков и нектаринов с различной степенью устойчивости к мучнистой росе, а также уровень повреждения мембран; вызванного инфицированием и действием 2,4-динитрофенолом (ДНФ).

#### Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований нами были использованы виды, сорта и формы персиков и нектаринов с различной степенью устойчивости к мучнистой росе из коллекции плодового отдела Никитского ботанического сада: устойчивые - персик Давида (*Persica davidiana* Carr.), персик мира (*P. mira* (Koehne) Koval. et Kost.), сорт персика ферганского Товарищ (*P. vulgaris* Mill. subsp. *Ferganensis*), межвидовой гибрид нектадиана 26-76 (*P. vulgaris* x *P. davidiana*); среднеустойчивые гибридные формы персик мира x Царевна-лебедь, Ветеран x Товарищ; сильно восприимчивые к мучнистой росе сорт персика обыкновенного (*P. vulgaris* Mill.) Ветеран и нектарин Лола. Исследования проводились в полевых условиях и в лаборатории при искусственном заражении отрезков листьев персиков конидиями гриба *Sphaeroteca pannosa* var. *persicae* Woronich. Степень пораженности изучаемых сортообразцов оценивали по 4-балльной шкале (табл. 1). Для определения содержания легкорастворимой формы белка (цитоплазматический белок) использовали листья семидневного возраста, которые брали непосредственно с деревьев. Навеску (1г) растирали в 10 мл трис-глицинового буфера pH 8,4, центрифугировали в течение 15 мин при 4200 оборотах в минуту для осаждения фрагментов клеточных стенок и внутриклеточных структур.

Таблица 1

Пораженность мучнистой росой (в баллах) видов, сортов и гибридных форм персиков и нектаринов в коллекции Никитского ботанического сада, 1991-1992 гг.

| Виды, сорта, формы           | июль | август |
|------------------------------|------|--------|
| Персик Давида                | 0    | 1      |
| Персик мира                  | 2    | 2      |
| Товарищ                      | СВЧ  | СВЧ    |
| Нектарин Лола                | 4    | 4      |
| Ветеран                      | 3    | 3      |
| Ветеран х Товарищ            | 2    | 2      |
| Персик мира х Царевна-лебедь | 2    | 2      |
| Нектадиана 26-76             | СВЧ  | СВЧ    |

СВЧ – реакция сверхчувствительности.

В супернатанте количество белка фотоколориметрическим методом с амидочерным [3]. Осмотический ( $\varphi_s$ ) и водный ( $\varphi_w$ ) потенциалы тканей листьев измеряли психрометрическим методом [6].

Для определения влияния инфицирования и обработки ДНФ на состояние клеточных мембран был поставлен эксперимент по искусственному заражению отрезков листьев персиков и нектаринов возбудителем мучнистой росы. Листья, по возможности сложенные лодочкой, брали с деревьев в утренние часы. Быстро доставляли в лабораторию и раскладывали в стерильные чашки Петри на ватные фильтры, смоченные 0,004% раствором бензимидазола. Под листья подкладывали стерильные предметные стекла. Срез листа закрывали стерильной полоской ватного фильтра, смоченного в растворе бензимидазола в той же концентрации. Часть отрезков листьев заражали конидиями *Sph. rapposa*, прикасаясь к ним ранее заразившимися листьями. В течение всего эксперимента в лаборатории поддерживалась оптимальная для развития гриба температура 18-22 °С.

Такое же количество отрезков листьев подвергалось действию  $10^{-3}$  М ДНФ, добавленного по 1 мл в чашки Петри. Затем чашки закрывали с целью сохранения влажности. Для изучения процессов экзосмоса отрезки листьев помещали в дистиллят из расчета 20-40 мл на 1 г сырых листьев. Через 2 часа определяли количество ионов  $K^+$  и нингидринпозитивных веществ (НПВ), перешедших в раствор. Измерения количества ионов  $K^+$  и НПВ, выделившихся из тканей листьев, осуществляли через 24, 78, 124, 144 часа с момента нанесения инокулюма и обработки ДНФ. Количество ионов  $K^+$  в инкубационном растворе измеряли с помощью мембранного ион-селективного электрода на иономере И-135. Содержание НПВ определяли фотоколориметрическим методом с нингидрином. Повторность опытов в полевых исследованиях пятикратная, в эксперименте по искусственному заражению – трехкратная. Экспериментальные данные обработаны статистически по методу условных отклонений для малых выборок [6].

### Результаты и обсуждение

Определение уровня осмотического и водного потенциалов тканей листьев видов и сортов персиков и нектаринов, контрастных по устойчивости к мучнистой росе, а также средне устойчивых гибридных форм позволило установить следующую

закономерность: листья высоко устойчивых сортообразцов (персик Давида, персик мира, Товарищ, Нектадиана 26-76) характеризуются высоким уровнем осмотического и водного потенциалов, сильно восприимчивые сорта (Ветеран, нектарин Лола) – низким уровнем этих показателей, среднеустойчивые гибридные формы (Ветеран х Товарищ и персик мира х Царевна-лебедь) занимают промежуточное положение (табл.2). Наши данные согласуются с результатами, полученными ранее на других культурах [16], в том числе и на персиках [2]. Считается, что уровень осмотического и водного потенциалов определяет пассивную устойчивость, поскольку для нормального поступления веществ из клетки растения-хозяина в гифу гриба-паразита необходимо, чтобы осмотическое давление клеточного сока в гифе значительно превышало осмотическое давление в клетках растения [9]. Аналогичная зависимость установлена при определении водорастворимой формы белка в листьях персиков и нектаринов: относительно более высокая концентрация белка характерна для сортообразцов устойчивых к *Sph. pannosa* (табл. 3). Корреляционный анализ перечисленных показателей позволил сделать вывод об их взаимозависимости поскольку большое количество цитоплазматического белка способствует увеличению концентрации клеточного сока, а значит высокому уровню осмотического и водного потенциалов (табл.4).

Таблица 2

Значения осмотического ( $\varphi_s$ ) и водного ( $\varphi_w$ ) потенциалов (бары) в тканях листьев персиков и нектаринов с различной степенью устойчивости к мучнистой росе

| Виды, сорта, формы            | $\varphi_s$       | $\varphi_w$       |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|
| Персик Давида                 | $-27,10 \pm 0,03$ | $-18,71 \pm 0,01$ |
| Персик мира                   | $-23,43 \pm 0,03$ | $-17,07 \pm 0,03$ |
| Товарищ                       | $-23,13 \pm 0,03$ | $-17,62 \pm 0,02$ |
| Ветеран                       | $-19,71 \pm 0,03$ | $-14,01 \pm 0,01$ |
| Нектарин Лола                 | $-18,41 \pm 0,03$ | $-14,07 \pm 0,04$ |
| Ветеран х Товарищ             | $-21,68 \pm 0,23$ | $-14,43 \pm 0,07$ |
| Персик мира х Царевна- лебедь | $-20,09 \pm 0,01$ | $-15,18 \pm 0,04$ |
| Нектадиана 26-76              | $-24,21 \pm 0,11$ | $-18,14 \pm 0,06$ |

Таким образом, можно считать, что установленные нами различия изучаемых параметров у контрастных по устойчивости к мучнистой росе видов, сортов, и гибридных форм определяют конституциональную устойчивость. Основываясь на результатах исследований, проводившихся ранее и свидетельствующих о том, что уровень водного потенциала тканей листьев персиков является показателем устойчивости этой культуры к засухе [11], а также исходя из общеизвестного положения о способности некоторых белков благодаря наличию в их структуре гидрофильных группировок связывать внутриклеточную воду, мы считаем, что величины осмотического и водного потенциалов, количество цитоплазматического белка в листьях персиков и нектаринов являются показателями устойчивости их как к действию стрессоров абиотической природы, так и к возбудителям инфекционных болезней, иными словами – показателями неспецифической конституциональной устойчивости.

Таблица 3

Количество водорастворимого белка в листьях персиков и нектаринов с различной степенью устойчивости к мучнистой росе

| Виды, сорта, формы           | Количество белка в мг на 1 г сырых листьев |
|------------------------------|--|
| Персик Давида                | 8,34 ± 0,04                                |
| Персик мира                  | 8,23 ± 0,04                                |
| Товарищ                      | 9,65 ± 0,04                                |
| Ветеран                      | 5,19 ± 0,02                                |
| Нектарин Лола                | 5,24 ± 0,04                                |
| Ветеран х Товарищ            | 7,76 ± 0,02                                |
| Персик мира х Царевна-лебедь | 7,12 ± 0,01                                |
| Нектадиана 26-76             | 9,46 ± 0,02                                |

Таблица 4

Коэффициенты корреляции между изучаемыми показателями

| Виды, сорта, формы           | Белок/<br>$\varphi_s$ | Белок/<br>$\varphi_w$ | $\varphi_w/\varphi_s$ |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              | Персик Давида         | 0,68                  |                       |
| Персик мира                  | 0,61                  | 0,56                  | 0,94                  |
| Товарищ                      | 0,62                  | 0,50                  | 0,83                  |
| Ветеран                      | 0,47                  | 0,51                  | 0,83                  |
| Нектарин Лола                | 0,83                  | 0,72                  | 0,96                  |
| Ветеран х Товарищ            | 0,64                  | 0,36                  | 0,78                  |
| Персик мира х Царевна-лебедь | 0,61                  | 0,56                  | 0,94                  |
| Нектадиана 26-76             | 0,65                  | 0,54                  | 0,66                  |

В настоящее время считается доказанным, что одной из первых реакций растения на раздражение (в том числе и неблагоприятного характера) является изменение регуляторных функций клеточной мембраны, выражающееся в изменении ее проницаемости. Если эти изменения не носят выраженного аномального характера, принято считать, что они являются признаком адаптации и свидетельствуют об устойчивости растения к стрессу. У неустойчивых к стрессу растительных форм такие изменения имеют патологическую направленность и являются следствием возрастания энтропии в живой системе. Инфицирование в лабораторных условиях отрезков листьев персиков и нектаринов грибом *Sph. pannosa* позволило определить степень повреждения мембран у сортообразцов с различной степенью устойчивости.

Экспериментально установлено, что конидии *Sph. pannosa* прорастают в течение 24 часов. К этому же моменту начинается выход ионов  $K^+$  и НПВ из тканей листьев персиков, причем более интенсивный из листьев неустойчивых сортов (рис. 1,2). С течением времени, прошедшего с момента инокуляции, наблюдалось непрерывное увеличение интенсивности экзосмоса ионов  $K^+$  и НПВ из тканей листьев сортов с низкой степенью устойчивости (Ветеран, нектарин Лола). У высокоустойчивых видов и форм (персик мира, персик Давида, нектадиана 26-76, Товарищ) усиление процессов экзосмоса менее выражено, а через 124 часа выход веществ из

тканей практически прекращается. Следовательно, можно считать, что устойчивость персиков к мучнистой росе определяется устойчивостью мембраны, иными словами, клеточные мембраны устойчивых видов и сортов персиков в меньшей степени подвержены повреждению, в результате чего затрудняется развитие болезни. На других видах растений достоверно установлено, что проникновение возбудителя болезни в клетки устойчивых и неустойчивых форм растений происходит одинаковым путем [1], при этом клеточные стенки и мембраны являются одним из первых барьеров, которые встречает патоген на своем пути в клетку, играя роль компонентов пассивной устойчивости.

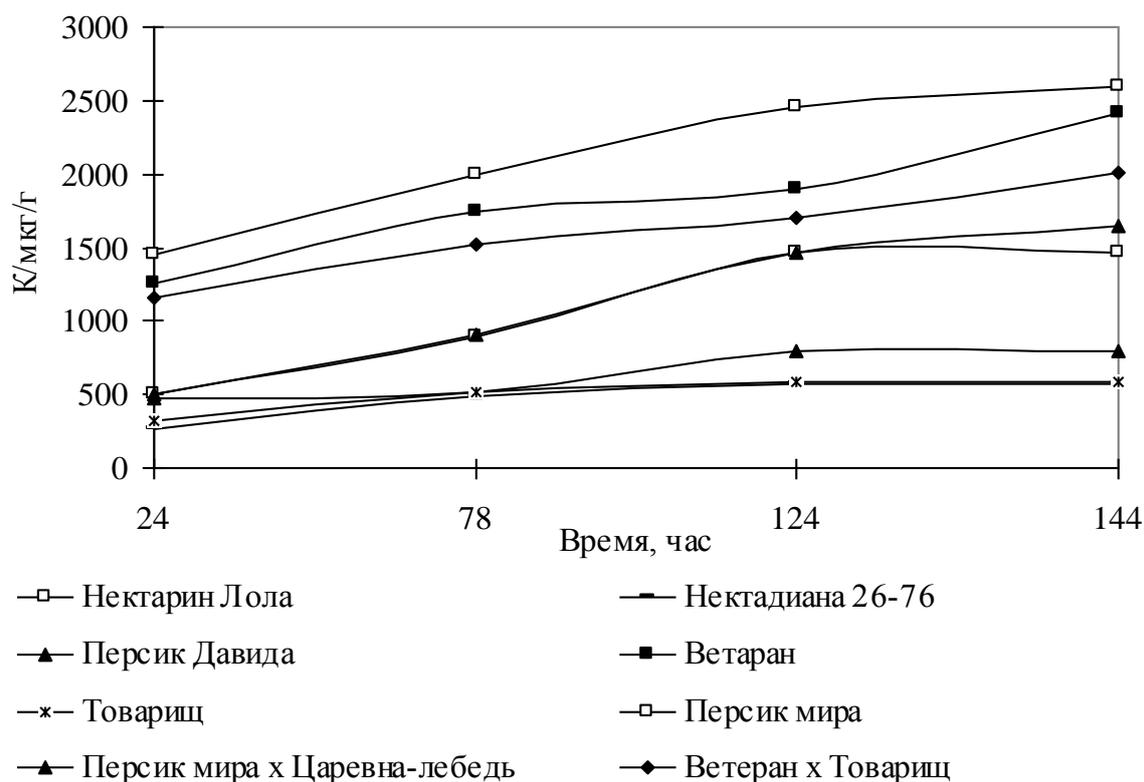


Рис.1. Изменение интенсивности экзосмоса ионов  $K^+$  (мкг/г сырого вещества) в зависимости от времени, прошедшего с момента инокуляции.

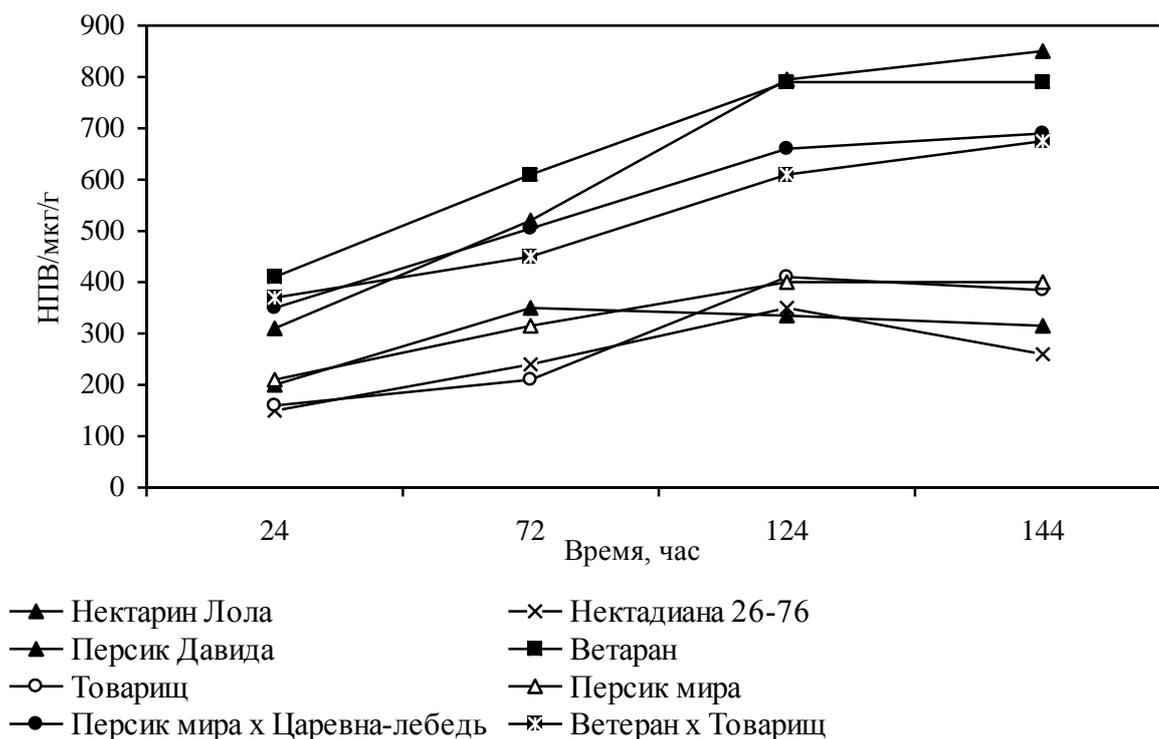


Рис. 2. Изменение интенсивности экзосмоса нингидринпозитивных веществ в зависимости от времени, прошедшего с момента инокуляции.

При изучении влияния ДНФ на состояние клеточных мембран нами получены сходные результаты (рис.3,4): экзосмос ионов  $K^+$  и НПВ из листьев персиков и нектаринов, контрастных по устойчивости к мучнистой росе, с течением после экспозиционного времени был наиболее интенсивным у неустойчивых образцов; минимальная интенсивность отмечена у высоко устойчивых видов и сортов; среднеустойчивые гибридные формы занимают промежуточное положение. Исходя из этого, можно предположить, что устойчивость мембран также относится к неспецифическим системам защиты. Сопоставляя полученные результаты с данными Р.К. Соляева, М.А. Корзун [15] об участии мембран в процессах осморегуляции при стрессе, мы предполагаем, что рассмотренные нами характеристики являются компонентами неспецифических защитных систем у персиков и нектаринов, которые должны быть учтены при изучении устойчивости данной культуры к инфекционным болезням и неблагоприятным факторам среды, прямо или опосредованно вызывающим состояние водного стресса у растения.

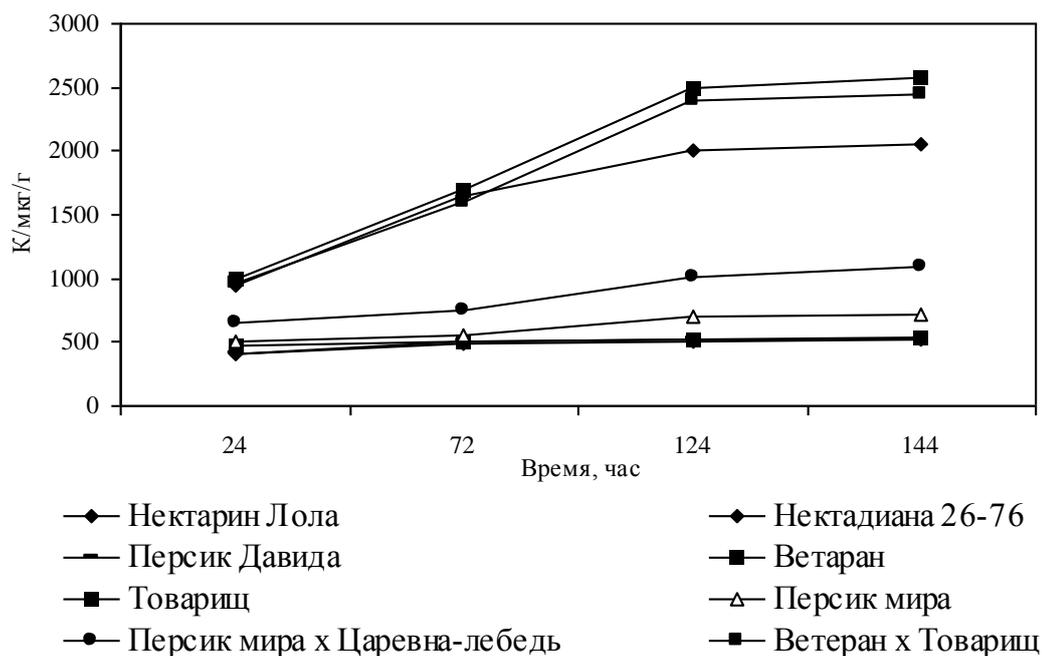


Рис.3. Изменение интенсивности экзосмоса ионов  $K^+$  в зависимости от времени, прошедшего после обработки листьев раствором 2,4-ДНФ

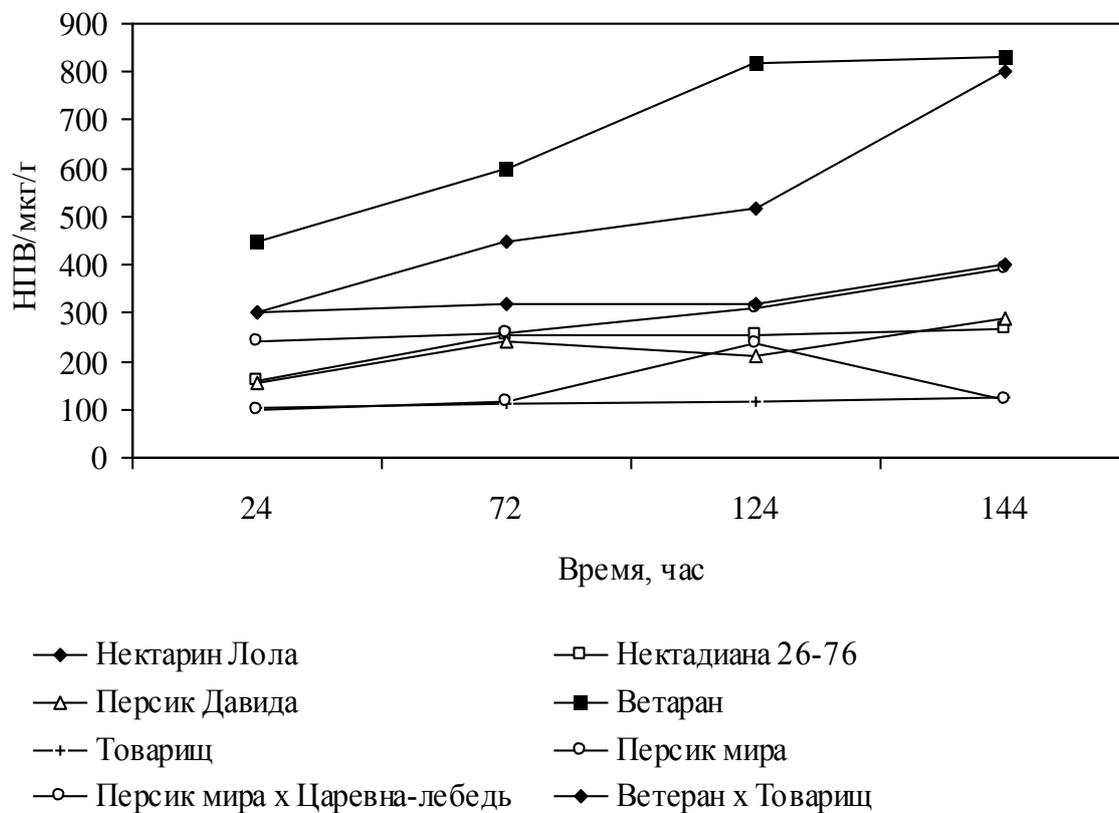


Рис.4. Изменение интенсивности процессов экзосмоса НПВ в зависимости от времени, прошедшего после обработки листьев раствором 2,4-ДНФ.

### Выводы

1. Ткани листьев устойчивых к мучнистой росе сортов персиков и нектаринов характеризуются более высоким содержанием белка, осмотическим и водным потенциалом по сравнению с сильно восприимчивыми сортами и формами.

2. Поражение листьев персиков и нектаринов мучнистой росой увеличивает проницаемость плазмалеммы для ионов  $K^+$  и  $НРВ$ , причем интенсивность экзосмоса тем сильнее, чем менее устойчив сорт.

3. Количество белка, величины осмотического и водного потенциалов, интенсивность процессов экзосмоса могут быть использованы для диагностики персиков и нектаринов на устойчивость к мучнистой росе.

### Список литературы

1. Аксенова В.А., Воронков Л.А., Гришкова В.Г. Анализ структурных особенностей клеточных мембран инфицированных растений в связи с их устойчивости к фитопатогенам // Молекул. и генетич. механизмы взаимодействия микроорганизмов и высших растений. - Пушино, 1989. С.126-130.

2. Брегадзе А.Г. Мучнистая роса персиков и борьба с ней в Грузинской ССР: Автореф дис. канд. Биол. наук.- Тбилиси, 1997. 25 с.

3. Бузун Г.А., Милешко Л.Ф., Джимухадзе К.М. Определение белка в растении с помощью амидочерного // Физиол. раст. – 1982. –Т. 29. № 1. – С.198-204.

4. Ван дер Планк Л. Устойчивость растений к болезням и вредителям. М.: Колос, 1972. -252 с.

5. Волчков Ю. А., Исачкина Т.И., Радецкий В.П. Идентификация форм персиков, устойчивых к мучнистой росе и кластероспорозу по морфотипу листа // Тез. докл. Всесоюз. Совещ. по иммунитету растений к болезням и вредителям. – Рига, 1986. - С. 20-22.

6. Глобус А.М. Экспериментальная гидрофизика почв. -Л.: Гидрометеиздат, - 197 с.

7. Гойман Э. Инфекционные болезни растений. - М.: ИЛ, 1954. – 164 с.

8. Горленко М.В., Ищенко Л.А. Активность окислительных ферментов у различных по устойчивости к парше сортов яблони // Бюл. Моск. о-ва испыт. природы. Отдел биол. –1965. -№2. – С. 90 - 92.

9. Горленко М.В. Краткий курс иммунитета растений к инфекционным болезням М.: Высшая школа, 1973 – 176 С.

10. Деева В.П. Физиолого-биохимическая природа регуляции адаптивных реакций генетически различных форм растений с помощью физиологически активных веществ // Регуляция адаптивных реакций с.-х. растений. – Кишинев, 1986. – С.11-19.

11. Ильницкий О.А., Лищук А.И. Определение стабильности водного режима в условиях атмосферной и почвенной засухи // Методические рекомендации по селекции плодовых культур / Под. ред. Лищука А.И. М.: ВАСХНИЛ, 1991. – С.40-43.

12. Ищенко Л.А., Инденко И.Ф., Котов Л.А., Пономаренко В.В. Наследование устойчивости к парше у различных форм яблони в связи с особенностями хозяина, паразита и среды // Бюл. ЦГЛ им. В.И. Мичурина. – 1982. – Вып.39. – .114-123.

13. Лакин Г.Ф. Биометрия М.: Высшая школа, - 1990. – 351 с.

14. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. Биохимия иммунитета, покоя и старения растений. М.: Наука, 1984. – 64 с.

15. Соляев Р.К., Корзун А.М., Пузанов В.И. О значении стрессового состояния мембран в осморегуляции растительных клеток // Ферменты, ионы, биоэлектrogenез у растений. – Горький. 1984. – С. 33-37.

16. Попкова К.В. Учение об иммунитете растений. – М.: Колос, 1973. – 23 с.

**Changes in metabolism of peaches and plumpeaches under their inoculation with *Sphaeroteca pannosa* and treatment by 2,4- dinitrophenol.**

Gubanova T.B., Lishchuc A. I., Ovcharenko G.V.

The quantity of albumen, osmotic and hydrogen potential in the leaves of species and forms of peaches and plumpeaches with the contrast great of firmness to the *Sphaeroteca pannosa* are defined. It was found out that leaves of firm kinds and forms the characterized with high albumen content, and osmotic potential and low intensivity of exosmos ions  $K^+$  and NPS under the infection.