

С.А. ПОЛЯКОВСКИЙ,
Ж.Н. КРАВЧУК, А.П. ДМИТРИЕВ
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
03143, Киев, ул. Акад. Заболотного, 148
dmyt@voliacable.com
polykovskiy@yandex.ru

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНДУКТОРА УСТОЙЧИВОСТИ β-АМИНОБУТИРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ У *ALLIUM SERA*



*Исследован механизм действия β-аминобутириловой кислоты (ВАВА) как индуктора устойчивости к некротрофным грибам *Botrytis spp.* у трех различных сортов лука (*Allium sera*). Показана способность низких концентраций ВАВА индуцировать устойчивость лука к шейковой и серой гнилям. Методом флюоресцентной микроскопии установлено, что обработка чешуй лука ВАВА приводит к праймированию реакции отложения каллозы, которая является основным механическим барьером на пути проникновения патогена. Однако реакции праймирования не выявлено у лука сорта Стерлинг, который не проявлял ВАВА-индуцированной устойчивости к грибам рода *Botrytis*.*

© С.А. ПОЛЯКОВСКИЙ, Ж.Н. КРАВЧУК, А.П. ДМИТРИЕВ,
2008

Введение. Результат взаимодействия патоген — растение зависит от того, насколько быстро растение сможет мобилизовать свои защитные механизмы, которые включают биохимические и структурные защитные реакции для того, чтобы остановить колонизацию патогеном [1, 2]. В начальной стадии инфицирования растение активирует защитные реакции в месте инвазии патогена. Это так называемая базальная устойчивость, которая иногда бывает крайне слабой или включается слишком поздно, чтобы остановить продвижение патогена. Помимо этого, растение способно повышать свой уровень устойчивости против последующих атак патогена путем формирования системной устойчивости. Классическим примером индуцированной устойчивости является системная приобретенная устойчивость (СПУ), которая наблюдается в дистальных частях растения при локализованном инфицировании некротрофным патогеном [3]. Считается, что механизм СПУ основан на эндогенном накоплении салициловой кислоты (СК) и обеспечивается транскрипционной активацией патоген-зависимых белков (ПЗБ) [4]. Определенные штаммы непатогенных ризобактерий тоже способны индуцировать системную устойчивость, так называемую индуцированную системную устойчивость, обусловленную ризобактериями (ИСУ) [5]. Она не связана с транскрипционной активацией ПЗБ и функционирует независимо от СК, но требует активации этилен- и жасмонат-зависимых путей трансдукции сигналов. Эффективно индуцировать устойчивость растений способны ряд синтетических и природных соединений-индукторов. К их числу относят 2,6-дихлоризоникотиновую кислоту и бензо-(1,2,3)-тиодиазол, которые индуцируют такой же спектр устойчивости, что и в случае СПУ. Показано, что β-аминобутириловая кислота (ВАВА), а также ряд других карбоновых кислот индуцируют устойчивость к широкому спектру заболеваний у различных видов растений [6, 7]. Следует отметить, что в последнем случае индуцированная устойчивость не связана с непосредственной активацией защитных реакций, а основана на более быстрой и сильной активации индуцибельных защитных механизмов в условиях стресса. Такое сенсibilизирование защитных механизмов называют «праймингом» (от англ. priming) [8]. Недавно было продемонстрировано, что прайминг

защитных реакций у растений приводит к увеличению устойчивости с минимальным влиянием на рост и урожайность [9]. Поэтому исследование молекулярных механизмов прайминга может послужить основой для создания эффективных и безопасных методов защиты растений от различных стрессов.

На протяжении последних нескольких лет ВАВА-индуцированная устойчивость является моделью для изучения молекулярных и физиологических механизмов прайминга защитных реакций у растений против патогенов [7, 10]. Цель настоящей работы состояла в тестировании эффекта ВАВА на индуцирование устойчивости лука к некротрофным грибам *Botrytis* spp. и исследовании возможных механизмов действия этого индуктора.

Материалы и методы. *Растительный и грибной материалы.* Для проведения экспериментов мы использовали луковицы трех различных сортов: полуострых сортов Сквирского, красного Ялтинского и сладкого сорта Стерлинг. Луковицы хранили при 4 °С в темноте и для экспериментов выдерживали 12 ч при комнатной температуре. Изоляты *B. allii* (15972) и *B. cinerea* (15702) были получены из коллекции Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Обработка растительного материала и инокуляция патогенами. Для экспериментов использовали мясистые чешуи луковиц, которые помещали на фильтровальную бумагу в пластиковые коробки. ВАВА растворяли в воде и вносили 1 мл 0,3 мМ раствора в чешуи, как в чашечки. Через 24 ч чешуи промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в коробки абаксиальной стороной вниз для инокуляции. Для продуцирования ограниченных некрозов чешуи лука инокулировали *B. cinerea*. Обширные некрозы получали используя *B. allii*. Инокулировали растительный материал путем нанесения 6 мкл суспензии спор (10^4 спор/мл – *B. allii*; $5 \cdot 10^4$ спор/мл – *B. cinerea*), ресуспендированных в стерильном картофельно-декстрозном бульоне (12 г/л; Difco). Инокулированный материал выдерживали при 100 % относительной влажности для развития инфекции.

Определение накопления каллозы. Для анализа реакции каллозообразования образцы отбира-

ли на 48-м часу после инокуляции. Для этого из чешуй вырезали диски диаметром 1 см, содержащие инфекционные капли, и инкубировали их в 96%-ном этаноле на протяжении 12 ч для удаления аутофлюоресцентного материала. После этого диски промывали в 0,07 М фосфатном буфере (рН 9,0) и инкубировали 15 мин в растворе 0,01 % анилинового голубого в 0,07 М фосфатном буфере (рН 9,0), содержащем 0,005 % калькофлуора (Fluorescent Brightener, Sigma). Материал помещали в 0,1%-ный раствор анилинового голубого в 0,007 М фосфатном буфере (рН 9,0) и выдерживали 12 ч. Исследования отложения каллозы проводили с использованием флюоресцентной микроскопии. Для приготовления препаратов в качестве среды использовали свежеприготовленный 0,01%-ный раствор анилинового голубого в 0,007%-ном фосфатном буфере (рН 9,0). Желто-зеленую флюоресценцию каллозы исследовали на флюоресцентном микроскопе ЛЮМАМ И-3 («ЛОМО», Россия), используя систему фильтров (ex – 340–380 нм и em – 425 нм).

Развитие инфекции оценивали через 72 ч после инокуляции, определяя диаметр некрозов с использованием световой микроскопии. Поскольку развитие гиф *B. allii* и *B. cinerea* происходит концентрически, результаты выражали как диаметр некроза. Для визуализации процесса колонизации чешуй лука грибами растительный материал окрашивали лактофенолом-трипановым голубым согласно [11].

Результаты исследований и их обсуждение. Для того чтобы продемонстрировать защитный эффект ВАВА у лука, ранее уже установленный для *Arabidopsis*, томата, винограда и ряда других видов растений [10, 12, 13], чешуи луковиц обрабатывали индуктором за один день до инокуляции специфическим и неспецифическим некротрофными грибами.

Оказалось, что ВАВА может эффективно защищать *A. cepa* от шейковой и серой гнилей лука, вызванных *B. allii* и *B. cinerea* соответственно (рис. 1). Защитный эффект против *B. cinerea* проявлялся уже при использовании ВАВА в концентрации 0,2 мМ (данные не приведены) и в концентрации 0,3 мМ составлял 31, 35 и 13 % у сортов Сквирский, Ялтинский и Стерлинг соответственно (рис. 2). Подобный уровень защиты наблюдали и в случае инокуляции спе-

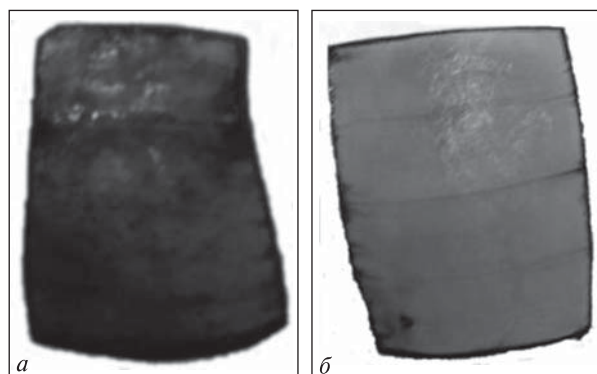


Рис. 1. Развитие инфекции в чешуях лука сорта Ялтинский, предобработанных водой (а) и 0,3 мМ ВАВА (б) и инокулированных *B. allii* путем опрыскивания суспензией спор (10^4 спор/мл). Окраска лактофенолом-трипановым голубым

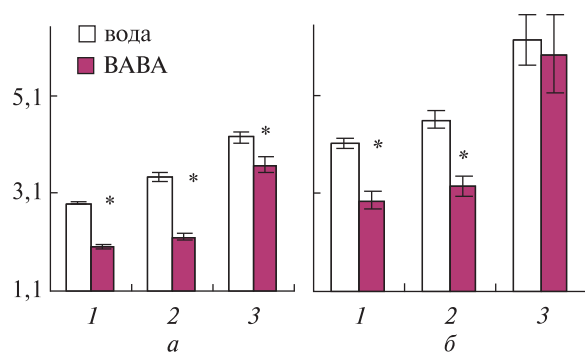


Рис. 2. Развитие некротической реакции в предобработанных водой (контроль) и ВАВА чешуях лука, инфицированных *B. cinerea* и *B. allii*, через 72 ч после инокуляции: по вертикали — диаметр некроза, мм; по горизонтали — 1 — Сквирский; 2 — Ялтинский; 3 — Стерлинг. * Статистически достоверные отличия между обработанными водой и ВАВА вариантами образцов ($P \leq 0,05$)

цифическим некротрофом *B. allii*. Однако ВАВА не индуцировала устойчивость к *B. allii* у сорта Стерлинг. Следует отметить, что сорт Стерлинг оказался наиболее чувствительным к некротрофным грибам среди выбранных нами сортов (рис. 2).

ВАВА является синтетической, не входящей в состав белков аминокислотой. ВАВА-индуцированная устойчивость не может быть результатом прямого антимикробного действия. Согласно результатам исследований, приведенных в работе [14], даже в концентрации 10 мМ, которая более чем в 30 раз превышает использо-

ванную нами, ВАВА не проявляет прямого антимикробного действия против ряда грибных и бактериальных патогенов. Защитный эффект ВАВА может быть только результатом активации защитных механизмов растения-хозяина. Чтобы понять природу устойчивости, индуцированной ВАВА, была исследована одна из важных ранних защитных реакций — накопление каллозы и ее роль в ВАВА-индуцированной устойчивости.

Каллоза представляет собой аморфный высокомолекулярный полимер β -1,3-глюкозы. В процессе инфекции растений оомицетами или грибами она откладывается в папилах, которые формируются в месте инвазии патогена. Каллоза является механическим барьером на пути проникновения патогена или служит матриксом, который концентрирует антимикробные соединения в местах проникновения [15, 16].

Обработка чешуй лука ВАВА не приводила к стимуляции синтеза каллозы (данные не приведены). Однако в случае инфицирования ВАВА-обработанных чешуй как *B. cinerea*, так и *B. allii* наблюдали стимуляцию образования каллозы в местах инвазии патогенов. Интенсивное отложение каллозы фиксировалось уже на 24–48-м часу после инокуляции патогенами в предобработанных ВАВА образцах (рис. 3). В контрольном варианте, предобработанном водой, отложение гранул каллозы начиналось с 48 ч инфицирования и достигало максимума к 72 ч. Таким образом, обработка лука ВАВА приводит к раннему и более интенсивному синтезу каллозы в местах инвазии некротрофных патогенов — праймированию реакции каллозообразования. За счет более быстрого и интенсивного отложения каллозы растение не дает возможности гифам грибов проникать в клетки и повреждать их. О важной роли каллозообразования как одной из ранних базальных реакций свидетельствует также и тот факт, что у сорта Стерлинг, который совсем не проявлял ВАВА-индуцированной устойчивости в ответ на инфицирование *B. allii*, а в ответ на *B. cinerea* наблюдали только незначительное ее увеличение, не происходило формирования и отложения каллозы. Неспособность ВАВА обеспечивать высокий уровень контроля шейковой и серой гнилей у лука сорта Стерлинг связана, на наш взгляд, с особенностями генотипа этого

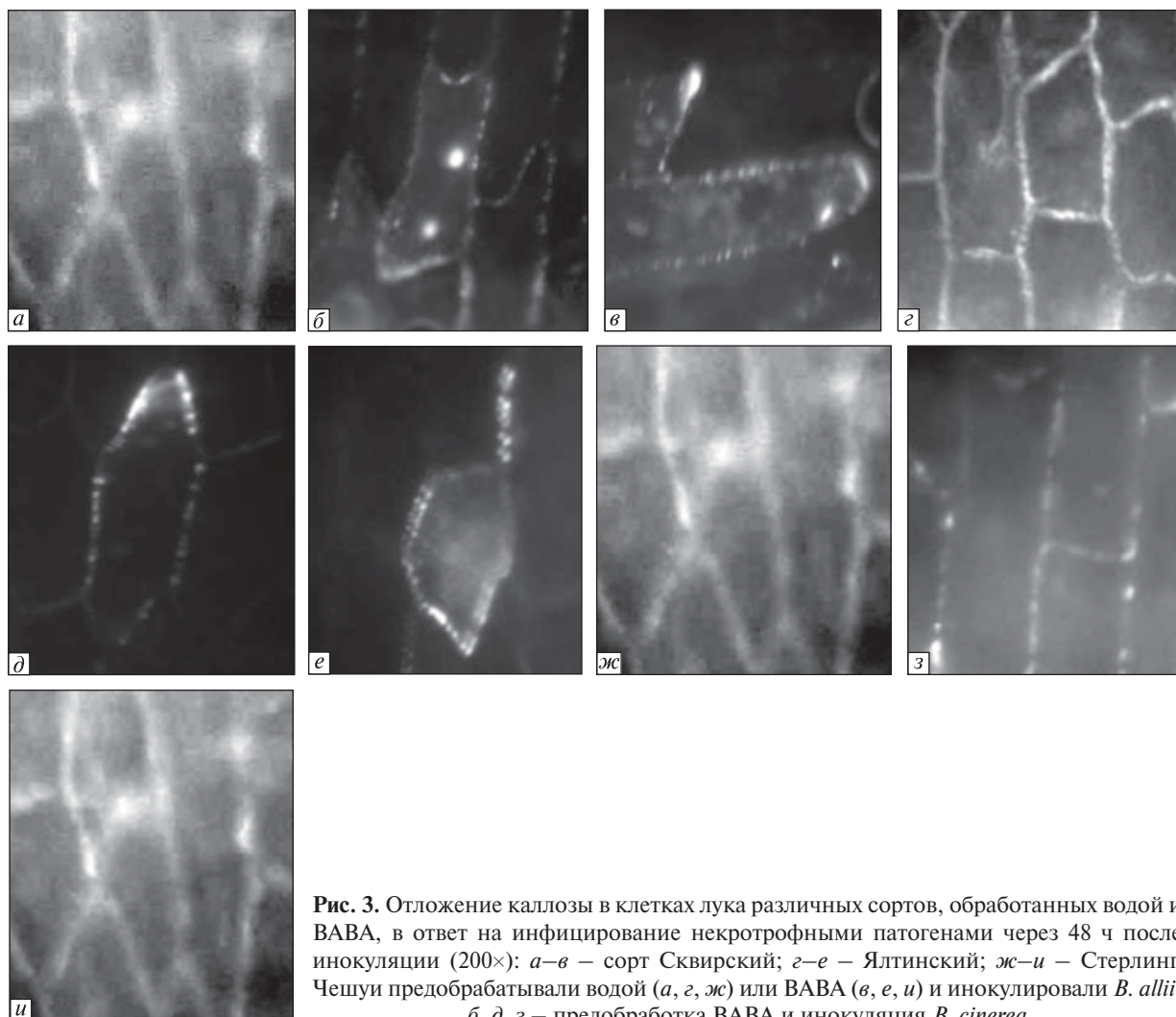


Рис. 3. Отложение каллозы в клетках лука различных сортов, обработанных водой и ВАВА, в ответ на инфицирование некротрофными патогенами через 48 ч после инокуляции (200 \times): а–в – сорт Сквирский; г–е – Ялтинский; ж–и – Стерлинг. Чешуи предобрабатывали водой (а, г, ж) или ВАВА (в, е, и) и инокулировали *B. allii*; б, д, з – предобработка ВАВА и инокуляция *B. cinerea*

сорта. Основным механизмом, обеспечивающим ВАВА-индуцированную устойчивость у лука, может быть прайминг реакции каллозообразования, который полностью отсутствовал в случае обработки индуктором сорта Стерлинг. Согласно данным последних публикаций [7, 10], прайминг реакции каллозообразования у *Arabidopsis* контролируется зависимым от абсцизовой кислоты сигнальным путем и полностью отсутствует у мутантов, дефектных по чувствительности к абсцизовой кислоте и по ее накоплению. Поэтому детальное исследование профайлинга фитогормонов у используемых сортов лука и в особенности сорта Стерлинг поможет предложить модель механизма ВАВА-индуцированной устойчивости у *A. сера*.

Выводы. Показано, что ВАВА в низких концентрациях (до 0,3 мМ) может эффективно индуцировать устойчивость репчатого лука к шейковой и серой гнилям. Предобработка ВАВА чешуй различных по устойчивости сортов лука приводила к значительному увеличению устойчивости к *B. allii* и *B. cinerea* у сортов Сквирский и Ялтинский. Исследование накопления каллозы свидетельствует о том, что механизм ВАВА-индуцированной устойчивости у *A. сера* может быть основан на праймировании реакции каллозообразования в ответ на инфицирование некротрофными патогенами. Более быстрое и интенсивное отложение каллозы, которая является основным механическим барьером на пути проникновения патогена, приво-

дит к увеличению устойчивости лука, предобработанного ВАВА, к гнилям. Однако ВАВА не способна праймировать накопление каллозы у сорта Стерлинг и, как результат, не индуцирует устойчивость этого сорта к грибам рода *Botrytis*. Ввиду возможности использования индукторов и, в частности, ВАВА в сельскохозяйственной практике интересны были бы более детальные исследования механизмов праймирования защитных реакций с помощью ВАВА.

S.A. Polyakovskiy, Zh.N. Kravchuk, A.P. Dmitriev

THE MECHANISMS OF ACTION OF PLANT RESISTANCE INDUCTORS BY THE EXAMPLE OF *ALLIUM CEPA*

The effects of β -aminobutyric acid as an inductor of plant resistance was studied. The influence of BABA pre-treatment on *A.cepa* plants of three different pathogen-resistant varieties was investigated by fluorescence microscopic methods. It was determined that BABA is able to prime the plant callose accumulation.

С.О. Поляковский,

Ж.М. Кравчук, О.П. Дмитриев

МЕХАНІЗМ ДІЇ ІНДУКТОРА СТІЙКОСТІ β -АМІНОБУТИРИЛОВОЇ КИСЛОТИ У *ALLIUM CEPA*

Вивчено дію β -амінобутирилової кислоти (ВАВА) як індуктора стійкості до некротрофних грибів *Botrytis spp.* у трьох різних сортів цибулі (*Allium cepa*). Показано здатність низьких концентрацій ВАВА індукувати стійкість цибулі до шийкової та сірої гнилей. Методом флуоресцентної мікроскопії встановлено, що обробка лусок цибулі ВАВА призводить до праймування реакції відкладання калози, яка є основним механічним бар'єром на шляху проникаючого патогена. Однак не виявлено реакції праймування у цибулі сорту Стерлінг, яка не проявляла ВАВА-індукованої стійкості до грибів роду *Botrytis*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дмитриев А.П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. – К.: Наук. думка, 2000. – 208 с.
2. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 298 с.
3. Ryals J., Neuenschwander U., Willits M., Molina A., Steiner H., Hunt M. Systemic acquired resistance // Plant Cell. – 1996. – 8. – P. 1809–1819.

4. Nawrath C., Metraux J.-P. Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation // Plant Cell. – 1999. – 11. – P. 1393–1404.
5. Pieterse C., Van Wees S., Van Pelt J., Knoester M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek P., Van Loon L. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis // Plant Cell. – 1998. – 10. – P. 1571–1580.
6. Zimmerli L., Metraux J.-P., Mauch-Mani B. β -aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* // Plant Physiol. – 2001. – 126. – P. 517–523.
7. Ton J., Jakab G., Toquin V. et al. Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming pathways in Arabidopsis // Plant Cell – 2005. – 17. – P. 987–999.
8. Conrath U., Beckers G., Flors V. et al. Priming: Getting ready for battle // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2006. – 19. – P. 1062–1071.
9. Van Hulten M., Pelsler M., van Loon L., Pieterse C., Ton J. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – 103. – P. 5602–5607.
10. Ton J., Mauch-Mani B. β -aminobutyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose // Plant J. – 2004. – 38. – P. 119–130.
11. Koch E., Slusarenko A. Arabidopsis is susceptible to infection by downy mildew fungus // Plant Cell. – 1990. – 2. – P. 437–445.
12. Yigal R., Cohen E. β -aminobutyric acid – induced resistance against plant pathogens // Plant Dis. – 86, № 5. – P. 448–452.
13. Hamiduzzaman M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J.-M., Mauch-Mani B. β -aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevines acts through potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2005. – 18. – P. 819–829.
14. Zimmerli L., Jakab G., Metraux J.-P., Mauch-Mani B. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – 97. – P. 12920–12925.
15. Aist J. Papillae and related wound plugs of plant cells // Annu. Rev. Phytopathol. – 1976. – 14. – P. 145–165.
16. An Q., Huckelhoven R., Kogel K., van Bel A. Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defense response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus // Cell. Microbiol. – 2006. – 8. – P. 1009–1019.

Поступила 12.09.07