

ГРИБЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 632.938 : 582.288 : 633.51

© Ж. Ж. Таштулатов, Т. Г. Гулямова, Д. М. Рузиева,
С. М. Насметова, А. М. Кербалаева, С. М. Ходжибаева

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ОТВЕТ РАСТЕНИЙ ХЛОПЧАТНИКА НА ДЕЙСТВИЕ ПАТОГЕНА *VERTICILLIUM DAHLIAE*

TASHPULATOV J. J., GULYAMOVA T. G., RUZIEVA D. M., NASMETOVA S. M.,
KERBALAEVA A. M., KHODZHIBAEVA S. M. ENZYMATIC RESPONSE
OF COTTON PLANTS ON ACTION OF PATHOGEN *VERTICILLIUM DAHLIAE*

Инфицирование вирусами, бактериями или грибами вызывает местные и системные ответы при несовместимых взаимодействиях между растениями и патогенами. Эти ответы включают локальный окислительный взрыв, который может привести к гибели инфицированных клеток, к изменению состава клеточных стенок в прилегающих тканях, препятствующему проникновению патогена, к синтезу *de novo* антимикробных веществ — фитоалексинов и PR-белков. Распространяясь далее по растению, местные ответы индуцируют изменения в еще неинфицированных частях растения, вызывая, таким образом, системный ответ (Heil, Bostock, 2002; Gozzo, 2003).

В последнее время особое внимание уделяется исследованию растительных ферментов как индикаторов защитного ответа растения, учитывая, что некоторые PR-белки обладают ферментативной активностью. Так, например, белки PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 классифицируются как эндохитиназы, их активность на коллоидном хитине варьирует более чем в 100 раз. PR-2 включает эндо- β -1,3-глюканазы, PR-9 — пероксидазы, PR-7 — эндопротеиназы. Структурно близки к рибонуклеазам PR-10 (Van Loon, Van Strien, 1999; Whipps, 2001).

Существуют данные о коррелятивном изменении активности ряда гидролитических ферментов, в том числе целлюлаз, протеаз, амилаз и ксиланаз, принадлежность которых к PR-белкам пока не установлена (Whipps, 2001). Например, показано, что этилен-индуцирующая ксиланаза, помимо деградации ксилана, выполняет заметную элиситорную роль в защитных реакциях в определенных сортах табака и томатов (Ron, Avni, 2004).

Вместе с тем приводятся данные об изменении активности целлюлазы, ксиланазы, амилазы, оксидоредуктазы, каталазы и других ферментов при заражении растений патогенами (Whipps, 2001), свидетельствующие о том, что в формирование защитных реакций растений может быть вовлечен довольно широкий спектр гидролитических ферментов. В этой связи представляет несомненный интерес выявление ферментов, способных служить молекулярными маркерами устойчивости хлопчатника к патогенам.

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ ферментативного ответа растений хлопчатника на действие патогенного гриба *Verticillium dahliae* Kleban.

Материал и методы

Для экспериментов использовали растения двух сортов хлопчатника: устойчивого к вилту С-5621 и восприимчивого Ак-курган-2. Растения хлопчатника в возрасте одного месяца собирали, корни отмывали от почвы. Проростки помещали в сосуды с водой (контроль) и в культуральную жидкость патогена в разведении 1 : 50. Растения выдерживали в течение 20—24 ч при комнатной температуре. По истечении времени инкубации растения вынимали и использовали для приготовления экстрактов листьев, стеблей и корней.

Бесклеточные экстракты частей растений получали путем гомогенизации на льду в 0.01 М Трис-НСl буфере, рН 7.2. Гомогенаты центрифугировали в течение 40 мин при 12 000 об./мин, осадок удаляли, а супернатанты использовали для определения активности ферментов.

В опытах использовали свежевыделенный из больных растений фитопатогенный гриб *V. dahliae*, высоковирулентный к хлопчатнику. Культуру хранили на среде Чапека—Докса при 4 °С и пересевали для экспериментов в чашки Петри на ту же питательную среду. Для приготовления инокулюма жидкую среду Чапека засеивали суспензией из клеток патогена (10^6 КОЕ/мл) и выращивали при температуре 27—30 °С на качалке при 120 об./мин в течение 5—6 суток.

Амилолитическую активность в бесклеточных растительных экстрактах определяли согласно ГОСТа 20264.64—89 с использованием 1 % крахмала в качестве субстрата; β -1,3-глюканазную и ксиланазную активность — по методу, описанному А. П. Синицыным и соавторами (1990), с использованием соответствующих субстратов — ламинарина и ксилана; хитиназную активность — по методу А. И. Мелентьева и Г. Э. Актуганова (1999), используя в качестве субстрата коллоидный хитин; пероксидазную активность — по методу А. И. Ермакова и соавторов (Методы..., 1972); содержание белка в экстрактах — по методу Лоури и соавторов (Lowry et al., 1951).

Результаты и обсуждение

Известно, что фитопатогенный гриб *V. dahliae* вызывает широко распространенное заболевание хлопчатника, известное как вертициллезное увядание, которое в отдельные годы приносит едва ли не самые разорительные последствия для урожая почти во всех хлопководящих государствах (Korolev et al., 2001).

Согласно имеющимся данным (Whipps et al., 2001), при инвазии этого патогена в различных частях растения появляется защитный ответ, представляющий собой комбинацию конститутивных и индуцированных защитных механизмов. Наряду с несколькими ферментами фенилпропаноидного метаболизма, вовлеченными в укрепление клеточных стенок, жизненно важное значение имеют PR-белки (Van Loon, Van Strien, 1999).

Несмотря на то что проблема вертициллезного вилта исследуется на протяжении многих лет, в настоящее время четкой картины защитного ответа хлопчатника на это заболевание пока еще нет. В частности, хотя существенные отличия в интенсивности защитного ответа наблюдали у устойчивых и восприимчивых к заболеванию сортов хлопчатника, различия в интенсивности ферментативного ответа не исследованы.

В этой связи был изучен ферментативный ответ устойчивого сорта С-5621 и восприимчивого сорта Ак-курган-2 на воздействие патогенного гриба *V. dahliae*. При сравнительном анализе распределения удельной ферментативной активности в отдельных исследуемых органах здоровых растений обоих сортов нами получены данные, свидетельствующие о преимущественной локализации активности большинства ферментов (кроме хитиназы и пероксидазы) в корнях здоровых растений по сравнению со стеблем и листьями.

Было установлено, что хитиназная активность в контрольных растениях устойчивого сорта С-5621 возрастает от корней к листьям (0.7 ± 0.08 , 2.2 ± 0.12 и 3.2 ± 0.3 Е/мг белка

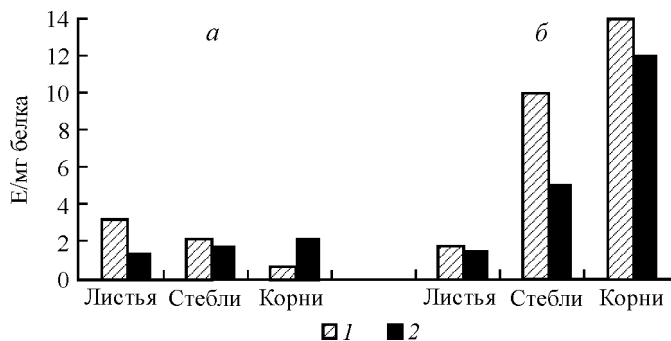


Рис. 1. Изменение хитиназной активности устойчивого С-5621 (1) и неустойчивого Ак-курган-2 (2) сортов хлопчатника при обработке патогеном.
а — контроль, б — патоген. То же для рис. 2—5.

в корнях, стеблях и листьях соответственно). В то же время у восприимчивого сорта Ак-курган-2 наибольшая хитиназная активность наблюдалась в корнях (2.0 ± 0.1 , 1.8 ± 0.15 и 1.0 ± 0.16 Е/мг белка в корнях, стеблях и листьях соответственно). При обработке корневой системы культуральной жидкостью патогена у обоих сортов наблюдается значительное повышение ферментативной активности во всех органах растений, но наибольшее повышение характерно для корней (рис. 1). Следует также отметить, что уровень активации фермента заметно выше в устойчивом сорте: 1.8 ± 0.15 , 10 ± 1.1 и 14 ± 1.5 Е/мг белка в листьях, стеблях и корнях соответственно.

При изучении β -1,3-глюканазной активности установлено, что распределение ферментативной активности в растениях обоих сортов происходит одинаково, наиболее высокая глюканазная активность отмечена в корнях контрольных растений. Однако при обработке культуральной жидкостью патогена ферментативный ответ в корнях растений устойчивого сорта (12.5 ± 1.7 Е/мг белка) значительно выше, чем у неустойчивого (9.5 ± 0.14 Е/мг белка; рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что и хитиназная, и глюканазная активность проявляют защитную реакцию, возрастая при обработке патогеном растений обоих сортов. Вместе с тем, как видно из представленных данных, в растениях сорта С-5621 защитный ответ проявляется в более высокой активации обоих ферментов по сравнению с сортом Ак-курган-2. Следует также отметить, что наибольший защитный ответ был отмечен локально в корнях — месте контакта патогена с растением.

Согласно литературным данным (Hill et al., 1999; Wu et al., 2004), при исследовании хитиназы, β -1,3-глюканазы и пероксидазы хлопчатника получены наиболее убедительные

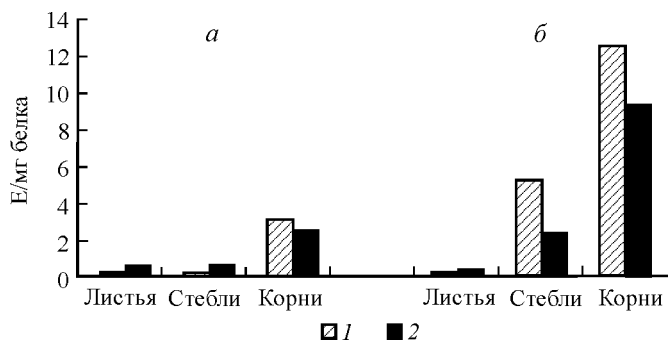


Рис. 2. Изменение β -1,3-глюканазной активности устойчивого С-5621 (1) и неустойчивого Ак-курган-2 (2) сортов хлопчатника при обработке патогеном.

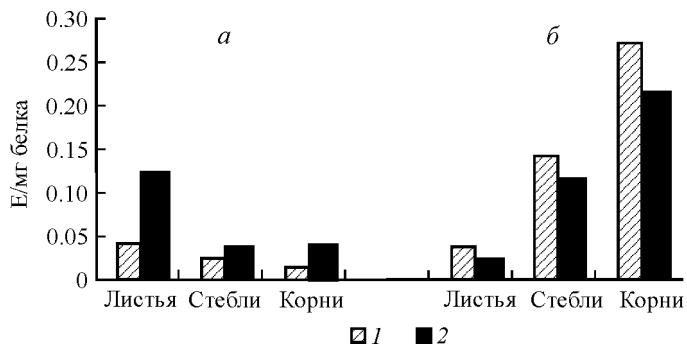


Рис. 3. Изменение пероксидазной активности устойчивого С-5621 (1) и неустойчивого Ак-курган-2 (2) сортов хлопчатника при обработке патогеном.

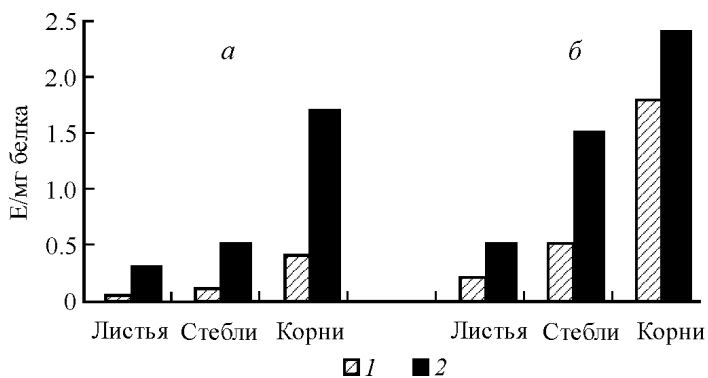


Рис. 4. Изменение амилазной активности устойчивого С-5621 (1) и неустойчивого Ак-курган-2 (2) сортов хлопчатника при обработке патогеном.

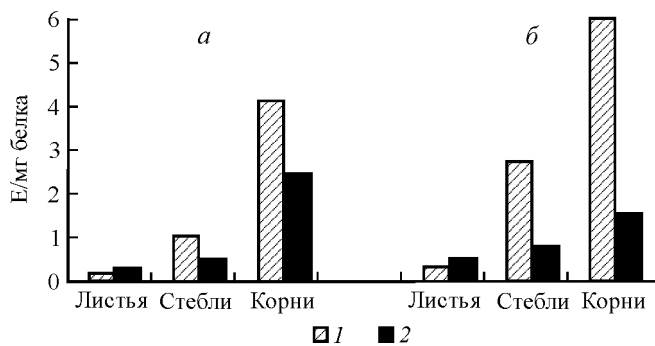


Рис. 5. Изменение ксиланазной активности устойчивого С-5621 (1) и неустойчивого Ак-курган-2 (2) сортов хлопчатника при обработке патогеном.

тельные данные о защитной роли ферментов. Так, например, о значении хитиназы и глюканазы в защитном ответе хлопчатника свидетельствуют данные, полученные при введении генов этих ферментов в геном хлопчатника с помощью *Agrobacterium tumefaciens* (Wu et al., 2004). Авторами было показано, что все семь полученных рекомбинантных линий хлопчатника и в полевых условиях, и в оранжевое устойчивы или толерантны к *Verticillium dahliae*.

О роли пероксидаз в защитном ответе свидетельствуют данные по корреляции пероксидазной активности с окислением гемигоссипола при образовании госсипола в экстрактах хлопчатника (Benedict et al., 2006). Ранняя аккумуляция пероксидаз в межклеточной жидкости рассматривается как часть реакции гиперчувствительности после обработки растений бактериями рода *Xanthomonas*. Более того, в клетках, проявляющих гиперчувствительность, высокая активация гваякол-пероксидазы сохраняется в течение 12 ч после обработки патогеном (Delannoy et al., 2003).

Было установлено, что в отличие от хитиназной и глюканазной активности наибольшая пероксидазная активность наблюдается в листьях растений обоих сортов, причем ферментативная активность восприимчивого сорта заметно выше (0.12 ± 0.03 Е/мг белка), чем устойчивого (0.04 ± 0.012 Е/мг белка). При обработке патогеном наблюдается преимущественно локальное возрастание ферментативной активности обоих сортов, при этом уровень защитного ответа устойчивого сорта заметно выше (0.27 ± 0.024 против 0.22 ± 0.018 Е/мг белка; рис. 3).

В противоположность этому при изучении амилазной активности выявлено, что ферментативная активность неустойчивого сорта, имея одинаковый характер распределения между органами независимо от сорта, значительно выше (1.7 ± 0.16 Е/мг белка), чем устойчивого (0.4 ± 0.11 Е/мг белка) и в контрольных, а также в обработанных патогеном растениях (2.4 ± 0.13 и 1.8 ± 0.15 Е/мг белка соответственно; рис. 4). При этом наибольший ответ на действие патогена также регистрируется в корнях.

Наиболее выраженная количественная разница между устойчивым и неустойчивым сортом обнаружена нами при изучении ксиланазной активности (рис. 5). Так, установлено, что у неустойчивого сорта Ак-курган-2 ксиланазная активность невысокая по сравнению с устойчивым сортом С-5621. При обработке патогеном ферментативная активность неустойчивого сорта почти не изменяется в листьях и стебле и двукратно снижается в корнях, в то время как у устойчивого наблюдается значительное возрастание во всех органах растения, причем наибольший ферментативный ответ также наблюдается в корнях (6.0 ± 0.12 Е/мг белка).

Совокупность полученных данных показывает, что, хотя характер изменения ферментативной активности в растениях устойчивого и неустойчивого сортов хлопчатника 30-суточного возраста совпадает, между ними наблюдается существенная количественная разница. В частности, устойчивый сорт С-5621 заметно превосходит восприимчивый Ак-курган-2 по продукции всех исследованных ферментов, за исключением амилазы. При этом наибольшая ферментативная активность в контрольных растениях обоих сортов, кроме пероксидазной, отмечена в корнях, а высокая пероксидазная активность — в листьях. Увеличение ферментативной активности в ответ на действие патогена во всех исследованных органах растений свидетельствует, на наш взгляд, о наличии защитных реакций в растениях обоих сортов. Вместе с тем в наших экспериментах наиболее выраженный ферментативный ответ проявляется в корнях — в месте непосредственного контакта растений с патогеном, распространяясь затем системно по стеблю и листьям.

Таким образом, на основании полученных данных системное возрастание хитиназной, пероксидазной, глюканазной, амилазной и ксиланазной активности можно рассматривать как часть защитной реакции хлопчатника на действие патогенного гриба *V. dahliae*.

Работа была выполнена в рамках гранта УНТЦ Р-226 «Биоконтроль вертициллезного вилта хлопчатника».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мелентьев А. И., Актуганов Г. Э. Выделение, очистка и характеристика хитиназы *Bacillus* sp. 739 // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. С. 624—628.
- Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, 1987. 429 с.
- Методы определения амилолитической активности // Препараты ферментные. ГОСТ 20264.4—89. М., 1989. 18 с.
- Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов // Итоги науки и техники. Т. 25. М.: ВИНТИ, 1990. С. 38—60.
- Benedict C. R., Liu J., Stipanovic B. Peroxidative coupling of hemigossypol to (+) and (-)-gossypol in cottonseeds extracts // *Phytochemistry*. 2006. Vol. 67. P. 356—361.
- Delannoy E., Jalloul A., Assigbetse K., Marmey P., Geiger J. P., Lherminier J., Daniel J. F., Martinez C., Nicole M. Activity class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight // *Molecular plant-microbe interactions*. 2003. Vol. 16. P. 1030—1038.
- Gozzo F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach // *J. Agr. Food Chem*. 2003. Vol. 51. P. 4487—4503.
- Heil M., Bostock R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the content of induced plant defences // *Ann. Bot*. 2002. Vol. 89. P. 503—512.
- Hill M. K., Lyon K. J., Lyon S. R. Identification of disease response genes expressed in *Gossypium hirsutum* upon infection with the wilt pathogen *Verticillium dahliae* // *Plant Molecul. Biol*. 1999. Vol. 40. P. 289—296.
- Korolev N., Perez-Artes E., Bejarano-Alcazar J., Rodriguez-Jurado D., Katan J., Katan T., Jimenez-Diaz R. M. Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel // *Europ. J. plant pathol*. 2001. Vol. 107. P. 443—456.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 191. P. 265—275.
- Ron M., Avni A. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato // *Plant cell*. 2004. Vol. 16. P. 1604—1615.
- Van Loon L. G., Van Strien E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins // *Physiolog. molecul. plant pathol*. 1999. Vol. 55. P. 85—97.
- Whipps J. M. Microbial interactions and biological control in the rhizosphere // *J. Exper. Bot*. 2001. Vol. 52. P. 487—511.
- Wu J. Y., Zhang H. L., Luo X. L., Tian Y. C., Chen Z. H. Transgenic cotton plants of chitinase and glucanase genes and their performance of resistance to *Verticillium dahliae* // *Yi Chuan Xue Bao*. 2004. Vol. 31. P. 183—188.

Институт микробиологии АН РУз
Ташкент
imbasru@uzsci.net

Поступила 18 III 2008

Р Е З Ю М Е

Изучен ферментативный ответ растений хлопчатника устойчивого сорта С-5621 и восприимчивого сорта Ак-курган-2 на воздействие патогенного гриба *Verticillium dahliae*. Показано, что сорт С-5621 заметно превосходит Ак-курган-2 по всем исследованным ферментам, за исключением амилазы. При сравнительном анализе распределения удельной ферментативной активности в отдельных исследуемых органах здоровых и больных растениях обоих сортов получены данные, свидетельствующие о преимущественной локализации активности большинства ферментов в корнях растений по сравнению со стеблем и листьями. Возрастание хитиназной, пем-

роксидазной, глюканиазной, амилазной и ксиланазной активности можно рассматривать как часть защитной реакции хлопчатника на действие патогенного гриба *V. dahliae*.

Ключевые слова: хлопчатник, ферментативный ответ на воздействие патогена, ферментативная активность, *Verticillium dahliae*.

S U M M A R Y

Enzymatic response of cotton resistant variety C-5621 and susceptible variety Ak-kurgan-2 on action of pathogenic fungus *Verticillium dahliae* was studied. It was established that resistant variety C-5621 considerably exceeds susceptible variety Ak-kurgan-2 by all studied enzymes except amylase. Comparative analysis of distribution of specific enzymatic activities in separate studied parts of healthy and infected plants of both varieties revealed prevailing localization of majority of enzymatic activity in roots of plants compared to stalks and leaves. Increase of chitinase, peroxidase, glucanase, amylase and xylanase activities may be considered as part of defensive reaction of cotton plants on action of pathogenic fungus *V. dahliae*.

Key words: cotton plants, enzymatic response on pathogen action, enzymatic activity, *Verticillium dahliae*.