

## МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 581.2+58.01/.07

АНОМАЛИИ РАННИХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ *ERYSIPHE GRAMINIS TRITICI* ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Г.А. Аветисян\*, Т.В. Аветисян

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4

\*e-mail: avetisyang@yandex.ru

Исследовали влияние окислительного стресса на начальные этапы взаимодействия возбудителя мучнистой росы пшеницы и растения-хозяина. Показано, что воздействие перекисью водорода и 3-амино-1,2,4-триазолом приводит к образованию аномальных ростковых трубок и нежизнеспособных колоний на поверхности листьев пшеницы. Явления, которые наблюдали при моделировании окислительного стресса путём воздействия прооксидантами, сходны с теми, которые ранее были описаны для устойчивых растений. Это позволяет предположить, что причиной аномального развития патогена на растениях может быть воздействие активных форм кислорода, возникающих в устойчивом растении в процессе защитных реакций.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, мучнистая роса, инфекционные структуры, перекись водорода, 3-амино-1,2,4-триазол, пшеница, окислительный стресс

В последние годы процесс первичной инфекции мучнисторосяными грибами изучался наиболее интенсивно, так как соответствующие исследования свидетельствуют о важности ранних стадий инфицирования для процесса развития заболевания [1, 2]. Первые этапы взаимоотношений растения-пшеницы и мучнисторосяного гриба зависят от способности патогена максимально реализовывать патологический процесс, т.е. процесс прорастания конидий и дифференциацию инфекционных структур, обеспечивающих заражение растения и дальнейшее развитие болезни [3, 4].

Процесс заражения пшеницы мучнистой росой состоит из ряда стадий. Конидия мучнисторосяного гриба, попадая на поверхность листа растения, образует вначале первичную ростковую трубку и затем аппрессориальную ростковую трубку, формирующую аппрессорий [5]. В случае восприимчивости растения к грибному патогену примерно через 24 ч после инокуляции внутри эпидермальной клетки растения-хозяина образуется гаустория, которая поглощает питательные вещества из клетки хозяина. Дальнейшее развитие гриба сопровождается ростом гиф мицелия и образованием гаусторий второго, третьего и т.д. порядков [6].

Развитие патогена на устойчивых растениях имеет свои особенности. При несовместимых комбинациях наблюдаются различные отклонения в дифференциации инфекционных структур патогена. Эти нарушения ведут к изоляции возбудителя болезни уже на первых этапах патогенеза, что способствует снижению инфекционной нагрузки.

Исследования последних лет показали важную роль в патогенезе мучнистой росы злаков активных

форм кислорода (АФК), которые являются посредниками активации иммунного ответа растения, а также участвуют в контроле структурной организации клеточной стенки [7, 8, 9]. Многими исследователями было установлено, что окислительный стресс влияет на ранние стадии развития *Erysiphe graminis* [2, 10].

В задачу данной работы входило изучение особенностей ранних стадий развития возбудителя мучнистой росы пшеницы под влиянием окислительного стресса. Окислительный стресс моделировали перекисью водорода и 3-амино-1,2,4-триазолом (3-АТА), который способствует повышению количества эндогенной перекиси водорода посредством ингибирования пероксидазы и каталазы [11].

## Материалы и методы

Для экспериментов были использованы растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и возбудитель мучнистой росы пшеницы *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal.

Семена растений пшеницы выращивали при температуре 20–22°C на растворе Кнопа в рулонах из фильтровальной бумаги. Пятнадцатидневные проростки пшеницы инокулировали конидиями *E. graminis*, культуру которой поддерживали на восприимчивой пшенице. Инфицированные отделенные листья проростков пшеницы инкубировали в чашках Петри с водными растворами перекиси водорода и 3-АТА абаксиальной стороной вверх. В контроле использовали дистиллированную воду.

На 5–6-е сут после инфицирования число видимых колоний возбудителя мучнистой росы подсчитывали с помощью бинокулярной лупы на не-

скольких участках поверхности листа растения площадью 1 см<sup>2</sup> каждый. Для каждого варианта опыта вычисляли среднюю плотность колоний на 15–30 препаратах.

Изучали влияние окислительного стресса и его предполагаемый защитный эффект на разных стадиях патогенеза. Исследуемые вещества вносили в среду инкубации отделенных листьев через определенные промежутки после инфицирования и на ограниченный период. Были выбраны концентрации 4 мМ и 10 мМ для 3-АТА и 5 мМ для перекиси водорода как минимальные концентрации с выраженным ингибированием развития мучнисторосяного гриба.

Динамику развития и дифференциации инфекционных структур возбудителя мучнистой росы исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого был отобран растительный материал на 3–9-е сут после инфицирования. Образцы листовой ткани исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа LEO-1430 VP (Carl Zeiss, Германия) без химической фиксации в условиях низкого вакуума (VP-режим) при комнатной температуре или в условиях высокого вакуума при –30 °С с применением замораживающей приставки Deben UK (Великобритания).

При сравнении результатов исследования контрольной и экспериментальной групп, а также изменений показателей в разные периоды времени использовали критерий Уилкоксона. Различия между значениями параметров считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

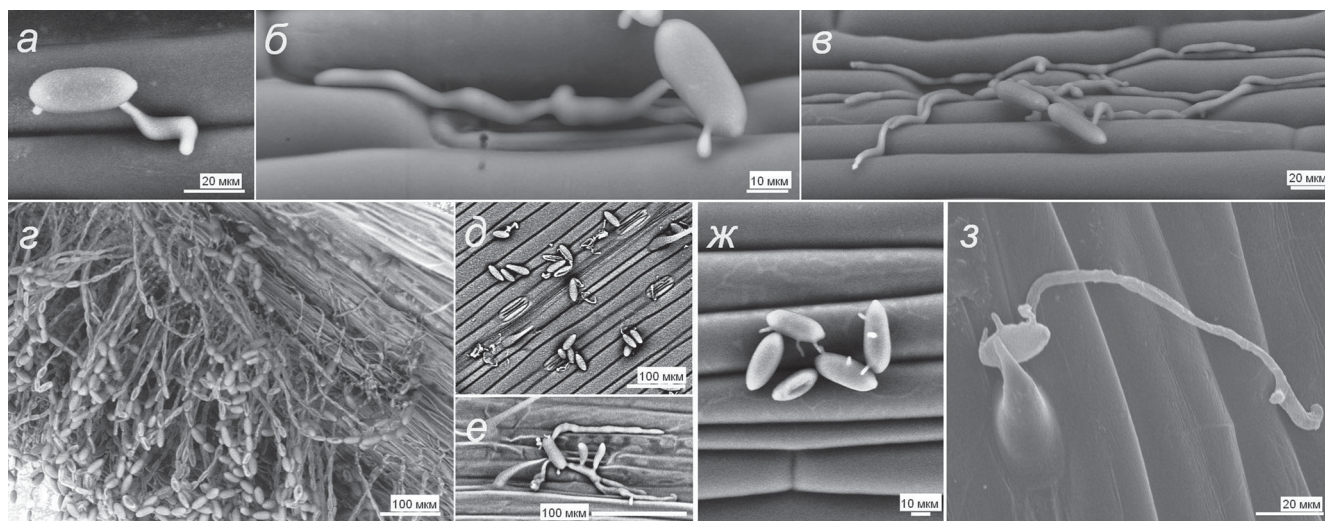
Конидии *E. graminis*, попадая на поверхность листьев пшеницы, прорастают, образуя первичную ростковую трубку и апрессорий в течение 24–48 ч

после инокуляции (рисунок, а). К концу данного периода внутри клетки эпидермиса растения-хозяина, как правило, образуется гаустория, служащая для поглощения питательных веществ. Через 48 ч в контроле у нормально развивающихся конидий можно наблюдать одну или несколько ростковых трубок, которые затем удлиняются, развиваясь в гифы эктофитного мицелия и формируя микроколонию (рисунок, б). Через 72 ч после инфицирования были заметны развитые колонии с гифами длиной до 400–450 мкм (рисунок, в).

Различия в формировании инфекционных структур гриба можно обнаружить уже через 24 ч после заражения. Так, воздействие 3-АТА увеличивало количество конидий, не способных к прорастанию (рисунок, д) или образующих аномальные инфекционные структуры (рисунок, е). К моменту образования в контроле развитых колоний с многочисленными конидиеносцами (рисунок, в) в вариантах с сильным ингибированием развития мучнистой росы в единичных случаях наблюдали только микроколонию. При этом они имели, как правило, многочисленные утолщенные и, вероятно, не функционирующие ростковые трубки (рисунок, е). При высоких концентрациях 3-АТА наблюдали образование множества зачатков гиф, не развивающихся в дальнейшем.

Развитие возбудителя мучнистой росы в присутствии перекиси водорода имело свои особенности. При концентрациях данного вещества 0,5–5 мМ наблюдали образование конидий с большим количеством ростковых трубок (рисунок, ж) или удлиненной апрессориальной ростковой трубкой (рисунок, з). При использовании 10 мМ перекиси водорода развитие патогена останавливалось на стадии формирования апрессория и дальнейшего образования колоний не происходило.

Ранее нами было показано, что обработка отделенных листьев пшеницы как 3-АТА, так и пе-



**Рисунок.** Этапы развития *Erysiphe graminis* на листьях пшеницы (СЭМ, 48–72 ч после инфицирования): а, б, в – контроль; г, д, е – при обработке инфицированных листьев пшеницы 3-амино-1,2,4-триазолом; ж, з – при обработке инфицированных листьев пшеницы перекисью водорода

рекистью водорода ингибирует развитие колоний патогена [12]. При увеличении концентрации данных веществ ингибирующая активность также возрастала, а высокие концентрации (10 мМ и более для 3-АТА и 5 мМ и более для перекиси водорода) полностью предотвращали развитие колоний патогена.

Далее нами были проведены исследования, направленные на изучение влияния окислительного стресса на разные этапы развития мучнисторосяного гриба (таблица). В варианте с постоянным присутствием 3-АТА в среде инкубации листьев наблюдали сильное ингибирование числа колоний. При этом более высокая концентрация оказывала более сильное действие. В остальных вариантах 3-АТА вносили на период 24 ч на первые, вторые и третьи сутки после инфицирования. Как видно из представленных данных, все варианты с обработкой 3-АТА в течение ограниченного времени также показали достоверное ингибирование инфекции ( $p < 0,001$ ). При этом наиболее сильное действие наблюдали на ранних этапах инфицирования (1 сут), что соответствует стадиям прорастания конидии, образования аппрессория и первичной гаустории. При обработке листьев пшеницы перекисью водорода также происходило достоверное ингибирование роста патогена, а в варианте с постоянным присутствием перекиси водорода во время всего эксперимента концентрация 5 мМ практически полностью предотвращала появление колоний.

Таблица

Влияние длительности применения 3-АТА и  $H_2O_2$  на развитие колоний мучнистой росы пшеницы на адаксиальной стороне листа (суммарное число колоний в расчете на  $1\text{ см}^2$ , повторность 15–30 препаратов). Данные представлены в виде средних арифметических значений и стандартных ошибок среднего

Время	Концентрация 3-АТА		Концентрация $H_2O_2$
	4 мМ	10 мМ	5 мМ
1 сут	7,7±1,3	1,3±0,2	1,2±0,2
2 сут	9,5±1,3	4,3±0,5	10,0±0,8
3 сут	8,7±1,0	3,6±0,7	5,3±0,4
С 1 по 3 сут	6,3±0,5	0,8±0,2	0,2±0,1
Контроль ( $H_2O$ )	17,2±1,6	12,2±1,4	15,1±0,9

Необходимо отметить сходные тенденции во времени применения обоих исследуемых веществ. Так, наибольшую активность наблюдали в тех вариантах с краткосрочной инкубацией в течение 24 ч в присутствии 3-АТА и экзогенной перекиси водорода, где данные вещества вносили в первые сутки после инфицирования. При их внесении на вторые сутки наблюдали менее выраженное ингибирование. При обработке на третьи сутки ингибирующее действие вновь несколько усиливалось.

Исследования последних лет показали, что характер патогенеза мучнистой росы злаков в значительной степени зависит от окислительного метаболизма [2, 7, 13]. Помимо непосредственного токсического воздействия на клетки патогена АФК действуют в качестве сигнальных молекул, принимая участие в индукции локальной и системной приобретенной устойчивости [14]. Активация кислорода является одним из самых ранних ответов растительной клетки на инфицирование. Время существенного повышения уровня АФК, т.е. время реакции растения на инфицирование, на начальных стадиях патогенеза играет важную роль, поскольку от него зависит момент включения активных защитных реакций растения.

В наших опытах экзогенная перекись водорода и 3-АТА ингибировали развитие мучнисторосяного патогена, существенно снижали интенсивность образования колоний и повышали устойчивость пшеницы к возбудителю мучнистой росы. Патоген-ингибирующая активность данных веществ возрастала с увеличением концентрации, и высокие концентрации полностью предотвращали развитие колоний патогена. По-видимому, ингибирующее действие экзогенных прооксидантов в определенной мере соответствует представлениям о защитной роли АФК при патогенезе.

Поскольку АФК обладают токсичностью не только по отношению к патогену, но и по отношению к самому растению-хозяину, в клетках растения их количество строго регулируется при участии антиоксидантных систем. Антиоксидантные защитные механизмы лимитируют продолжительность жизни АФК, защищая клетку от вредного воздействия перекиси водорода, образованной при восстановлении молекулярного кислорода. Таким образом, увеличение количества перекиси водорода ограничено во времени. Наряду с интенсивностью образования АФК время начала и время окончания окислительного “взрыва”, по-видимому, играют важную и до сих пор мало исследованную роль в регуляции иммунного ответа клетки хозяина.

В наших опытах данный аспект действия АФК моделировали путем кратковременного внесения экзогенных прооксидантов в разные сроки после инокуляции патогена. Показано, что продолжительность воздействия данными веществами оказывает влияние на величину ингибирующего эффекта. При этом стадии развития мучнисторосяного патогена, соответствующие первым и третьим суткам после инфицирования, имеют большую чувствительность, или, наоборот, стадии развития патогена, протекающие на вторые сутки, более устойчивы к ингибированию. По-видимому, большее ослабление ингибирования на вторые сутки в случае перекиси водорода можно объяснить её быстрым разложением после окончания инкубации. В то же время, накопленное в течение 2 сут количество



3-АТА продолжает действовать и в последующий период, когда патоген вновь оказывается чувствительным к ингибитору.

Развитие мицелия мучнисторосяных грибов злаков происходит на поверхности листьев растений. Этот факт облегчает исследование данного патогена с помощью СЭМ. Как показали наши исследования, обработка перекисью водорода и 3-АТА ингибирует формирование колоний возбудителя мучнистой росы и подавляет рост патогена на ранних стадиях развития. Аномальная дифференциация инфекционных структур возбудителя мучнистой росы также происходила при концентрациях 3-АТА и экзогенной перекиси водорода, близких к тем, которые ингибировали развитие видимых невооруженным глазом колоний.

Как известно, некоторые соединения могут оказывать влияние на раннее развитие фитопатогенных грибов и вызывать появление аномальных инфекционных структур. Например, подавление апрессориального развития происходило у некротрофного гриба *Cochliobolus miyabeanus* при обработке метилглиоксаль бис-гуанилгидразом, ингибитором синтеза полиаминов [15].

В наших экспериментах при воздействии перекисью водорода и 3-АТА происходило замедление роста мучнисторосяного патогена. В обоих случаях наблюдали появление конидий с большим количеством ростковых трубок — аномалии, которые редко встречаются у контрольных растений. Вместе с тем при использовании 3-АТА происходило нехарактерное для перекиси водорода образование

множества зачатков гиф при высоких концентрациях и утолщенных коротких гиф при низких концентрациях. При использовании перекиси водорода даже в достаточно высоких концентрациях, полностью или почти полностью ингибирующих развитие колоний, наблюдали большое количество апрессориев внешне нормальной морфологии.

Таким образом, особенности взаимного распознавания растения и патогена могут проявляться уже на ранней стадии взаимодействия. Предпринятые нами исследования показали, что некоторые черты воздействия на мучнисторосяной патоген, характерные для перекиси водорода или общие для перекиси водорода и 3-АТА, а именно, появление аномально длинных апрессориев или ростковых трубок, характерны также для развития данного патогена на листьях устойчивых растений [16]. Количество апрессориев с нормальной морфологией коррелирует с плотностью колоний возбудителя мучнистой росы. Это свидетельствует о том, что нарушение дифференциации инфекционных структур приводит к снижению точек контакта с растением и при аномалиях ростковых трубок происходит дальнейший поиск мест новых контактов, при этом проникновение в эпидермальную клетку растения-хозяина и образование гаустории не происходят. Полученные нами данные позволяют предположить, что причиной аномального развития мучнисторосяного патогена на листьях пшеницы может быть воздействие АФК, возникающих в устойчивом растении при прохождении защитных реакций.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huckelhoven R., Fodor J., Preis C., Kogel K.H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. N 4. P. 1251–1260.
2. Trujillo M., Altschmied L., Schweizer P., Kogel K.H., Huckelhoven R. Respiratory burst oxidase homologue A of barley contributes to penetration by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* // *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. N 14. P. 3781–3791.
3. Huckelhoven R. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 245. N 1. P. 9–17.
4. Шкаликов В.А., Дьяков Ю.Т., Смирнов А.Н., Джалилов Ф.С.-У., Стройков Ю.М., Коновалов Ю.Б., Гриценко В.В. Иммуитет растений. Москва: КолосС, 2005. 190 с.
5. Kunoh H., Kunoh K., Ishizaki H. Cytological studies of the early stages of powdery mildew in barley and wheat. XI. Autofluorescence and galos at penetration sites of appressoria of *Erysiphe graminis hordei* and *Erysiphe pisi* on barley coleoptiles // *Can. J. Bot.* 1985. Vol. 63. N 9. P. 1535–1539.
6. Шервуд Р.Т., Вэнс К.П. Первичные изменения в клетках эпидермиса при проникании паразита // *Инфекционные болезни растений: физиологические и биохимические основы* / Под ред. Ю.Т. Дьякова. М.: Агропромиздат, 1985. С. 34–53.
7. Vanacker H., Carver T.L.W., Foyer C.H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction // *Plant Physiology.* 2000. Vol. 123. N 4. P. 1289–1300.
8. Walters D., Cowley T., Mitchell A. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. N 369. P. 747–756.
9. Feng H., Li X., Duan J., Li H., Liang H. Chilling tolerance of wheat seedlings is related to an enhanced alternative respiratory pathway // *Crop Sci.* 2008. Vol. 48. N 6. P. 2381–2388.
10. Shetty N.P., Lyngs Jrgensen H.J., Jensen J.D., Collinge D.B., Shetty H.S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens // *Eur. J. Plant Pathol.* 2008. Vol. 121. N 3. P. 267–280.
11. Perez F.J., Rubio S.N. An improved chemiluminescence method for hydrogen peroxide determination in plant tissues // *Plant Growth Regul.* 2006. Vol. 48. N 1. P. 89–95.
12. Аветисян Г.А. Цитофизиологические особенности ранних стадий развития возбудителя мучнистой росы пшеницы при моделировании окислительного стресса: дисс. канд. биол. наук. Москва, 2011. 130 с.

13. Hückelhoven R., Dechert C., Kogel K.-H. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. Vol. 100. N 9. P. 5555–5560.

14. Дьяков Ю.Т., Озерцовская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов, 2001. 301 с.

15. Ahn I.-P. Glufosinate ammonium-induced pathogen inhibition and defense responses culminate in disease protection in bar-transgenic rice // Plant Physiology. 2008. Vol. 146. N 1. P. 213–227.

16. Мишина Г.Н., Серезкина Г.В., Аветисян Т.В., Рябенко А.С., Андреев Л.Н. Особенности формирования гало в процессе патогенеза как ответная реакция эпидермальных клеток злаков на проникновение возбудителей мучнистой росы // Изв. РАН. Сер. биол. 2001. № 4. С. 424–430.

Поступила в редакцию  
16.02.2017

Принята в печать  
06.03.2017

## MYCOLOGY AND ALGOLOGY

### ANOMALIES OF THE EARLY STAGES OF DEVELOPMENT OF *ERYSIPHE GRAMINIS TRITICI* UNDER OXIDATIVE STRESS

G.A. Avetisyan\*, T.V. Avetisyan

N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences,  
Russian, 127276, Moscow, Botanicheskaya ul., 4  
\*e-mail: avetisyang@yandex.ru

We report on investigation of early stage interactions between powdery mildew pathogen and host plant. We demonstrated that treatment of wheat leaves with various concentrations of hydrogen peroxide and 3-amino-1,2,4-triazole resulted in formation of morphological anomalies of germ tubes and non-viable colonies on host plant leaves. The observed effect of oxidative stress on germination anomalies of powdery mildew is similar to previously reported interactions between the pathogen and mildew resistant plants. Based on this work we conclude that abnormal infectious structure formation of wheat powdery mildew may be associated with increased presence of reactive oxygen species during plant defense responses.

**Key words:** active oxygen species, powdery mildew pathogen, infectious structures, hydrogen peroxide, 3-amino-1,2,4-triazole, wheat, oxidative stress

#### Сведения об авторах

Аветисян Гаянэ Акоповна — канд. биол. наук, науч. сотр. Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-495-977-80-00; e-mail: avetisyang@yandex.ru

Аветисян Тамара Владимировна — мл. науч. сотр. Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-495-977-80-00; e-mail: tarverdiantv@yandex.ru