

УДК 577.1:632.938.1

## САЛИЦИЛОВАЯ И ЖАСМОНОВАЯ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *Septoria nodorum* Berk.

© 2011 г. Л. Г. Яруллина, Н. Б. Трошина, Е. А. Черепанова, Е. А. Заикина, И. В. Максимов

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054  
e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 09.12.2010 г.

Исследовано влияние медиаторов сигнальных систем салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот и их смеси на образование АФК (супероксидного радикала  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ ), активность оксидоредуктаз (оксалатоксидазы, пероксидазы, каталазы) в листьях пшеницы *Triticum aestivum* L., инфицированных возбудителем септориоза *Septoria nodorum* Berk. Предпосевная обработка семян СК и ЖК снижала степень развития гриба на листьях пшеницы. СК оказывала более ранний индуцирующий эффект на синтез  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  по сравнению с ЖК. Защитное действие салициловой и жасмоновой кислот против возбудителя септориоза было обусловлено активацией оксалатоксидазы, индукцией анионных и катионных пероксидаз и снижением активности каталазы. Способность соединений стимулировать образование АФК в растительных тканях можно использовать в качестве критерия для оценки иммуномодулирующей активности новых средств защиты растений.

Индукция защитного ответа в растениях против патогенов осуществляется с помощью различных сигнальных систем [1]. Известными их медиаторами являются салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты [2, 3]. Доказано, что СК, как интермедиат НАДФН-оксидазной системы, стимулирует защитные реакции растений против болезней, вызываемых биотрофными патогенами, посредством индуцирования в них компонентов системно-приобретенной устойчивости (СПУ), в том числе регуляции активности ферментов про-антиоксидантной системы, накопления фенольных соединений, укрепления клеточной стенки в зоне инфицирования за счет отложения лигнина [4, 5]. В отношении ЖК–интермедиата липоксигеназной сигнальной системы, показано, что в обработанных ею растениях в ответ на поранение насекомыми-вредителями и некротрофную инфекцию индуцируется системная индуцированная устойчивость (СИУ), компонентами которой являются активация ингибиторов протеиназ и ферментов антиоксидантной защиты [6]. Поскольку в некоторых случаях тип питания у возбудителей грибных болезней бывает смешанным (гембиотрофы), как у *Septoria nodorum* Berk., то представляет значительный интерес выяснение роли СК и ЖК в таких системах.

Ранее нами была выявлена важная роль оксалатоксидазы в генерации  $H_2O_2$  и формировании защитного ответа растений пшеницы к грибным патогенам [7]. Ее активация и сопряженная генерация  $H_2O_2$  под воздействием СК и хитоолигосахаридов повышали устойчивость пшеницы к возбудителям твердой головни и корневой гнили

[8, 9]. Предобработка растений интермедиатами сигнальных систем и их смесями с элиситорами весьма перспективна в сельском хозяйстве для защиты растений, поскольку такие компоненты эффективны даже в наномолярных концентрациях [10]. Однако для создания подобных препаратов необходимы новые сведения о механизмах индуцирования сигнальными молекулами устойчивости к патогенам при участии про-антиоксидантной системы растений, поскольку в некоторых случаях они могут обладать супрессорным эффектом на иммунную систему растений.

Цель работы – изучение образования различных форм АФК, изменений активности оксалатоксидазы, каталазы, изоферментного спектра пероксидазы в связи с формированием устойчивости растений пшеницы к грибу *Septoria nodorum* Berk. под воздействием салициловой и жасмоновой кислот, а также их смеси.

### МЕТОДИКА

**Объект исследования.** Опыты проводили на отрезках листьев *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 24, выращенной из предобработанных (3 ч) растворами  $10^{-6}$  М салициловой (ч.д.а., “Реахим”, Россия) и  $10^{-7}$  М жасмоновой (ч.д.а., “Реахим”, Россия), а также их смесью (1 : 1). Семена проращивали на фильтровальной бумаге при комнатной температуре. Полностью развернутые листья 7 сут проростков срезали, помещали во влажную камеру на фильтровальную бумагу, срезы прикрывали ватой, смоченной в растворе бензимидазола (40 мг/л) [11]. Отрезки листьев инокулировали суспензией

пикноспор *S. nodorum* Berk. ( $10^6$  спор/мл), которые были выделены авторами из местной популяции гриба. Инокулированные листья выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение 24 ч, после чего переносили на искусственное освещение с фотопериодом 16 ч/сут. Интенсивность развития гриба на эпидермисе листьев оценивали через 24 ч, генерацию  $H_2O_2$  в мезофилле листьев — через 48 ч, интенсивность симптомов болезни — через 72 ч после инокуляции. В качестве контроля использовали неинфицированные и инфицированные листья растений, не обработанные СК и ЖК.

**Определение  $H_2O_2$  и  $O_2^{\cdot-}$ .** Отрезки листьев гомогенизировали в 0.025 М фосфатном буфере, pH 6.2 (ФБ), в соотношении 1 : 3, центрифугировали 20 мин при 10000 g на центрифуге фирмы “Eppendorf” (Германия). Супернатант использовали для определения содержания  $H_2O_2$  и  $O_2^{\cdot-}$ . Концентрацию  $O_2^{\cdot-}$  определяли при длине волны 530 нм с использованием 0.6 мМ нитротетразолия синего (НТС) фирмы “Sigma” (США). Коэффициент молярного поглощения формазана, образовавшегося при восстановлении НТС супероксидным радикалом, принимали равным  $15000 M^{-1} cm^{-1}$  [12]. Содержание  $H_2O_2$  оценивали при 560 нм с использованием ксиленолового оранжевого [13]. Реагент содержал 0.074% соли Мора в 5.81% серной кислоте и 0.009% ксиленолового оранжевого в 1.82% сорбита (в соотношении 1 : 100). Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на спектрофотометре Biospek-Mini фирмы “Shimadzu” (Япония).

Интенсивность образования  $H_2O_2$  оценивали также на гистологических срезах по окислению 3,3-диаминобензидина (ДАБ) по методу, изложенному в работе [14]. Синтез  $H_2O_2$  оценивали по количеству окрашенных клеток через 48 ч после инокуляции.

**Активность оксалактоксидазы (КФ 1.2.3.4).** Цитоплазматическую (свободнорастворимую) фракцию фермента выделяли с использованием 0.05 М сукцинатного буфера, pH 3.8 (СБ) [15]. Для этого отрезки листьев гомогенизировали в СБ при соотношении массы навески листьев к объему СБ (1 : 3). Экстракт центрифугировали 20 мин при 12000 g (“Eppendorf”, Германия). Реакционная смесь для определения активности оксалактоксидазы содержала 100 мкл СБ, 0.0025 М щавелевую кислоту (“Реахим”, Россия), 50 мкл ферментной вытяжки и коммерческой пероксидазы хрена фирмы (“Диаэм”, Россия) в концентрации 15 ед./мл и 0.08%-ный хромогенный субстрат *o*-фенилендиамин (ОФД, “Реахим”, Россия).

**Активность каталазы (КФ 1.11.1.6).** Растительную ткань растирали в 50 мМ растворе ФБ, pH 7.8. Отношение массы навески к объему буфера ФБ 1 : 10. После центрифугирования 25 мин при 12000 g на центрифуге 5415К (“Eppendorf”, Германия) супернатант использовали для анализа активности фермента. Реакцию инициировали добавлением 0.1 мл супернатанта к 2 мл 0.03%-ного раствора

$H_2O_2$ . В контрольную пробу вместо супернатанта вносили 0.1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4%-ного молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 410 нм против контрольной пробы.

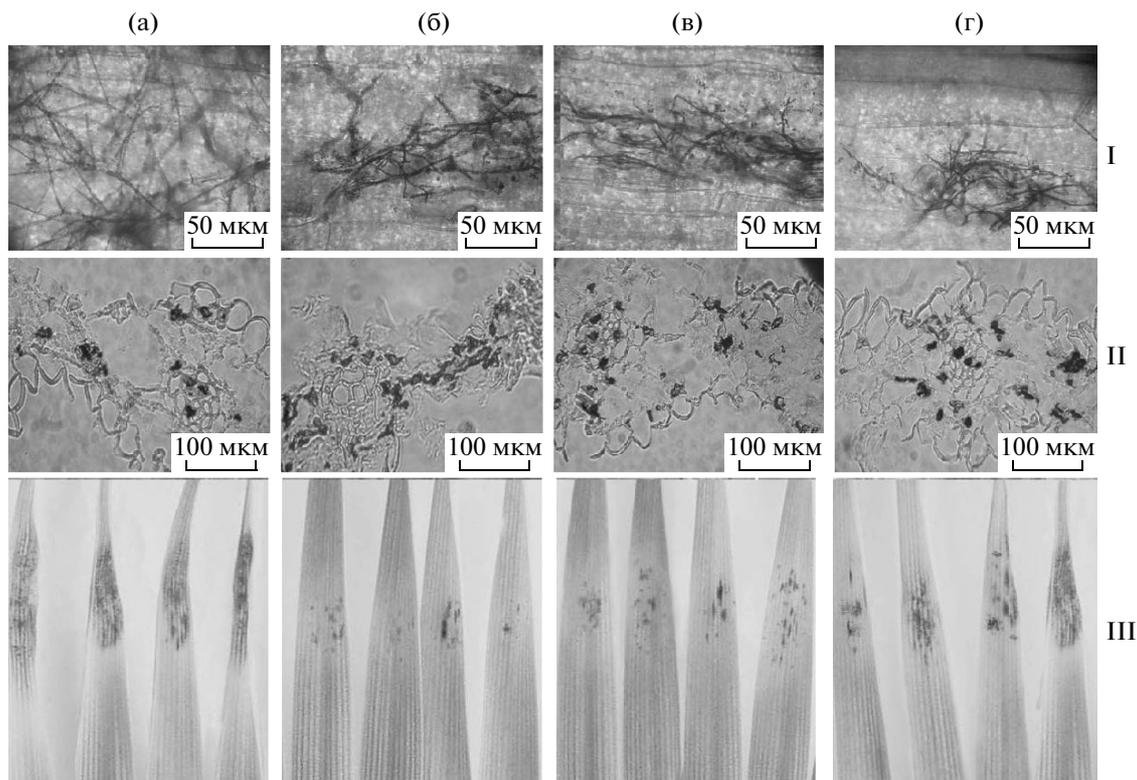
Активность каталазы рассчитывали по формуле:  $E = (A_k - A_o) / VtK$ , где  $E$  — активность каталазы (мкМ  $H_2O_2$ /мг белка мин),  $A_k$  и  $A_o$  — поглощение контрольной и опытной проб соответственно,  $V$  — объем вносимой пробы, 0.1 мл,  $t$  — время инкубации, 600 с,  $K$  — коэффициент миллимолярного поглощения  $H_2O_2$ , равный  $22.2 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ .

**Активность пероксидазы (КФ 1.11.1.7).** Для выделения цитоплазматической фракции пероксидазы отрезки листьев гомогенизировали в 0.01 М Na-фосфатном буфере, pH 6.2 (ФБ). Отношение массы навески листьев к объему ФБ 1 : 3. Экстракт центрифугировали 25 мин при 12000 g на центрифуге 5415К (“Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для анализа активности пероксидазы. Активность фермента определяли по окислению 0.15%-ного ОФД в присутствии 0.0015%  $H_2O_2$  в 0.01 М ФБ.

Оптическую плотность окисленного ОФД при определении оксалактоксидазы и пероксидазы оценивали при 490 нм на приборе для иммуноферментного анализа Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Единица активности фермента соответствовала количеству окисленного субстрата, вызывающему увеличение единицы оптической плотности  $\Delta A$  за 1 мин. Для сравнительного анализа активность выражали в отн. ед. на 1 г сырой мысы.

**Изоферментный спектр пероксидазы.** Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) белковых экстрактов проводили на приборе фирмы “Хийу-Калтур” (Эстония) с использованием 7%-ного полиакриламидного геля (ПААГ) и 2.5% изолинов фирмы “MP Biomedicals” (США). Перед нанесением на гель образцы выравнивали по содержанию белка и диализовали против дистиллированной воды. Активность изопероксидаз в геле выявляли 0.01%-ным раствором 3,3-диаминобензидина солянокислого с 0.005%  $H_2O_2$  в 0.1 М ФБ. После проявления ферментативной активности гели анализировали с использованием сканера (“Genius”, США). Определение pI пероксидаз пшеницы проводили с использованием диагностических наборов белков с диапазоном pI от 3.5 до 10.6 (“Sigma”, США).

**Статистическая обработка данных.** Опыты проводили в 3 биологических повторах. В каждом варианте опыта фиксировали по 10 листьев. На рисунках приведены средние результаты опыта и их стандартные ошибки.



**Рис. 1.** Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот и их смеси на интенсивность прорастания спор (I), генерацию  $H_2O_2$  в клетках мезофилла в зоне инфицирования (II) и развитие симптомов септориоза (III) в листьях пшеницы: а – контроль, б – обработка СК; в – обработка ЖК, г – обработка смесью СК + ЖК. I, II, III – 24, 48 и 72 ч после инокуляции соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние СК и ЖК на развитие гриба *S. nodorum* на листьях пшеницы.** Наблюдение за ростом возбудителя септориоза на эпидермисе листьев показало, что в контроле уже через 24 ч после инокуляции мицелий гриба густо покрывал поверхность листа (рис. 1а, I). В вариантах опыта с применением СК, ЖК и их смеси прорастание спор было менее интенсивным (рис. 1б, 1в, 1г, I). Признаки развития септориоза в контрольных листьях наблюдались через 24 ч после инфицирования в виде слабого обесцвечивания листьев с последующим их побурением, а через 72 ч после инокуляции симптомы септориоза проявлялись в виде крупных бурых пятен (рис. 1а, III). В листьях растений, предобработанных СК и ЖК, симптомы болезни были выражены слабее, чем в контроле (рис. 1б, 1в, III). Однако в варианте со смесью СК + ЖК через 72 ч после инокуляции симптомы болезни проявлялись практически с той же интенсивностью, что и в контрольном варианте (рис. 1г, III). Таким образом, при обработке семян как СК, так и ЖК наблюдался слабый рост гриба на листьях в течение 72 ч наблюдений, что указывает на индуцирование устойчивости пшеницы к септориозу в этих вариантах опыта. В то же время в варианте опыта с предобработкой растений смесью СК + ЖК в начале

инфекционного процесса гриб развивался медленно, но затем его развитие ускорилось.

**Влияние СК и ЖК на образование АФК в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum*.** Образование АФК является одним из наиболее ранних ответов растительных клеток на контакт с патогеном, в результате чего индуцируются защитные реакции растения. Известно, что первым звеном в патоген-индуцируемой окислительной вспышке является активация связанной с клеточной мембраной НАДФН-оксидазы и генерация супероксидного радикала, который при участии супероксиддисмутазы преобразуется в  $H_2O_2$  [1]. Так, подавление образования  $O_2^{\cdot-}$  приводило к восприимчивости растений пшеницы к возбудителю ржавчины [16].

Исследования показали, что в ответ на инфицирование возбудителем септориоза в листьях пшеницы наблюдалось повышение концентрации  $O_2^{\cdot-}$  через 24 ч после инокуляции (таблица). В предобработанных СК и ЖК листьях синтез всех форм АФК усиливался (таблица). Причем при инфицировании под воздействием СК индуцируется более раннее повышение уровня АФК (24 ч после инокуляции) по сравнению с обработкой ЖК. В варианте СК + ЖК высокий уровень обра-

Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот и их смеси на накопление супероксидного радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) и  $H_2O_2$  в листьях пшеницы сорта Башкирская 24 при инфицировании грибом *S. nodorum*

Вариант	Время после инфицирования, ч		
	24	48	72
$O_2^{\cdot-}$ , нМ/мг сырой массы			
Контроль	73.0 ± 3.7	81.1 ± 3.2	62.0 ± 3.9
<i>S. nodorum</i>	98.1 ± 4.1	92.3 ± 4.6	79.1 ± 2.1
СК	99.2 ± 3.7	88.1 ± 6.1	74.2 ± 2.4
СК+ <i>S. nodorum</i>	165.0 ± 6.8	118.2 ± 9.9	98.1 ± 5.5
ЖК	89 ± 3.7	124.3 ± 5.8	96.3 ± 3.9
ЖК+ <i>S. nodorum</i>	126.2 ± 8.7	149.0 ± 7.2	94.1 ± 4.3
СК + ЖК	101 ± 3.9	112 ± 6.7	80.2 ± 3.4
СК + ЖК + <i>S. nodorum</i>	131 ± 8.6	123 ± 5.9	107.3 ± 4.2
$H_2O_2$ , мкМ/мг сырой массы			
Контроль	18.3 ± 0.7	10.1 ± 0.6	7.2 ± 0.3
<i>S. nodorum</i>	22.7 ± 1.5	15.9 ± 0.9	8.6 ± 0.2
СК	21.0 ± 1.3	14.1 ± 0.7	9.7 ± 0.3
СК + <i>S. nodorum</i>	38.8 ± 2.5	20.7 ± 0.8	10.8 ± 0.5
ЖК	20.4 ± 0.8	21.9 ± 0.5	11.3 ± 0.2
ЖК + <i>S. nodorum</i>	29.2 ± 1.6	26.8 ± 1.3	12.1 ± 0.4
СК + ЖК	24.3 ± 1.4	28.3 ± 1.7	15.2 ± 0.7
СК + ЖК + <i>S. nodorum</i>	30.1 ± 1.7	34.3 ± 1.2	21.3 ± 0.9

зования АФК прослеживался на протяжении 48 ч после инфицирования. В литературе имеются сведения об индуцировании СК раннего образования супероксидного радикала в клетках мезофилла листьев пшеницы при инфицировании возбудителем бурой ржавчины [17] и значительном увеличении содержания  $H_2O_2$  под воздействием обработки ЖК на более поздних стадиях патогенеза [18].

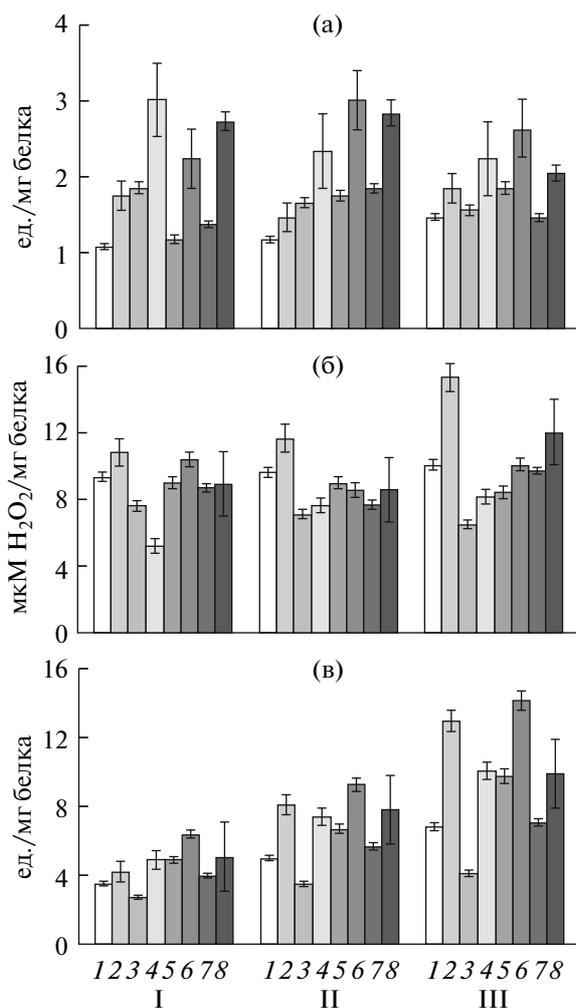
Генерация  $H_2O_2$  в клетках мезофилла листьев под воздействием исследуемых соединений и их смеси была исследована также с помощью красителя диаминобензидина. Обнаружено, что и в инфицированном контроле, и во всех вариантах опыта  $H_2O_2$ -продуцирующие клетки наблюдались в мезофилле листьев спустя 48 ч после инокуляции (рис. 1, II). Причем в опытных вариантах количество  $H_2O_2$ -продуцирующих клеток было больше (рис. 1б, 1в, 1г, II), чем в контроле (рис. 1а, II).

**Влияние СК и ЖК на активность оксалаксоксидазы при инфицировании грибом *S. nodorum*.** В ответ на инокуляцию листьев возбудителем септориоза происходило повышение активности оксалаксоксидазы (рис. 2а, 2). СК оказывала эффективное индуцирующее действие на активность оксалаксоксидазы как в здоровых растениях (рис. 2а, 3), так и при инфицировании, особенно на ранних этапах патогенеза (рис. 2а, 4). Так, в предобработанных СК листьях че-

рез 24 ч после инокуляции активность этого фермента превышала показатель контрольного варианта в 3 раза (рис. 2а, 4). Подобное действие ЖК на индукцию фермента проявлялось на более поздних этапах взаимоотношений растительных клеток с грибом (48 ч после инокуляции) (рис. 2а, 6). Индуцирующее действие смеси СК + ЖК на активность оксалаксоксидазы проявлялось на протяжении 48 ч после инокуляции (рис. 2а, 8).

Изменение уровня АФК в растительных тканях происходит в результате многих метаболических процессов, в том числе изменения в активности про-4-антиоксидантных ферментов. Известно, что наибольший вклад в накопление АФК вносит активация оксидаз, среди которых оксалаксоксидаза является патоген-индуцируемым белком и важнейшим компонентом прооксидантной системы растений [19]. Ранее нами была выявлена активация оксалаксоксидазы и повышение уровня  $H_2O_2$  в тканях пшеницы под влиянием возбудителей корневых гнилей, твердой головни и обработке индукторами устойчивости [4, 20]. Таким образом, одним из возможных механизмов индуцируемого сигнальными молекулами накопления  $H_2O_2$  в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum* является активация оксалаксоксидазы.

**Влияние СК и ЖК на активность каталазы при инфицировании *S. nodorum*.** Ранее нами было по-



**Рис. 2.** Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на активность оксалатоксидазы (а), каталазы (б) и пероксидазы (в) в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum*: 1 – контроль, 2 – инфицирование *S. nodorum*, 3 – обработка СК; 4 – обработка СК + инфицирование *S. nodorum*; 5 – обработка ЖК, 6 – обработка ЖК + инфицирование *S. nodorum*, 7 – обработка смесью СК + ЖК, 8 – обработка смесью СК + ЖК + инфицирование *S. nodorum*. I – 24, II – 48, III – 72 ч после инокуляции.

казано, что возбудитель септориоза способен секретировать каталазу в среду культивирования, причем высокоагрессивные штаммы *S. nodorum* характеризовались более активным синтезом внеклеточной каталазы по сравнению с слабоагрессивными [21]. Предполагается, что за счет секреции в растительные ткани каталазы гриб подавлял генерацию АФК в местах локализации и обеспечивал себе успешный рост и развитие.

Исследования показали, что в инфицированных листьях пшеницы активность каталазы постепенно возрастала, достигая максимального значения через 72 ч после инокуляции (рис. 2б, 2). СК оказывала ингибирующее действие на каталазную активность,

как в здоровых (рис. 2б, 3), так и в инфицированных листьях пшеницы (рис. 2б, 4). В ходе эксперимента под воздействием СК каталазная активность снижалась уже через 24 ч после инокуляции (рис. 2б, 4). Ингибирующее действие ЖК на каталазную активность проявлялось спустя 48 ч после инокуляции (рис. 2б, 6). При совместном использовании СК и ЖК активность каталазы на протяжении 24 ч незначительно отличалась от контрольного варианта (рис. 2б, 7, 8). Поскольку  $H_2O_2$  является необходимым компонентом развития локальной и системной устойчивости растений, то подавление каталазной активности под воздействием СК и ЖК способствует индукции защитного ответа пшеницы к *S. nodorum* (рис. 1б, 1в, III).

**Влияние СК и ЖК на активность и изоферментный состав пероксидазы в листьях пшеницы при инфицировании грибом *S. nodorum*.** В инфицированных листьях пшеницы под влиянием возбудителя септориоза наблюдалось повышение активности пероксидазы (рис. 2в, 2). Предобработка растений пшеницы СК, ЖК и их смесью оказывала существенное влияние на активность и изоферментный спектр пероксидаз как неинфицированных, так и инфицированных растений. Так, если в предобработанных СК здоровых растениях активность фермента была ниже, чем в контроле на всем протяжении опыта (рис. 2в, 3), то в предобработанных и инфицированных она плавно возрастала в ходе эксперимента (рис. 2в, 4). Ранее нами было также обнаружено подобное действие СК на активность пероксидазы при инфицировании растений пшеницы возбудителем септориоза [8]. В предобработанных ЖК как здоровых (рис. 2в, 5), так и инфицированных (рис. 2в, 6) листьях, пшеницы активность пероксидазы поддерживалась на весьма высоком уровне. В сочетании с СК индуцирующее действие ЖК на активность пероксидазы снижалось (рис. 2в, 7, 8).

Анализ влияния СК, ЖК и их смеси выявил определенные различия в спектре изоформ пероксидазы инфицированных растений (рис. 3, 4, 6, 8). Вероятно, повышение активности фермента в растениях при инфицировании под воздействием сигнальных молекул происходило как за счет активации анионной пероксидазы с  $pI \sim 3.5$ , так и катионной изоформы пероксидазы с  $pI \sim 9.6$  (рис. 3, 4, 6). Интересно, что ЖК, в отличие от СК, индуцировала появление катионной изоформы фермента с  $pI \sim 9.8$  (рис. 3, 6). При совместном применении смеси сигнальных молекул активировались как анионные изоформы пероксидазы ( $pI \sim 3.5$ ), участвующие в лигнификации [22], так и катионной изоформы с  $pI \sim 9.6$  (рис. 3, 8).

Особенностью гриба *S. nodorum* является гембиотрофный тип паразитизма. Свое развитие возбудитель септориоза начинает на живых растительных тканях, но на определенном этапе патогенеза может колонизировать погибшие ткани растения-хозяина [23]. Предполагается, что в зависимости от типа паразитизма возбудителя болезни растения активируют различные сигнальные системы с целью

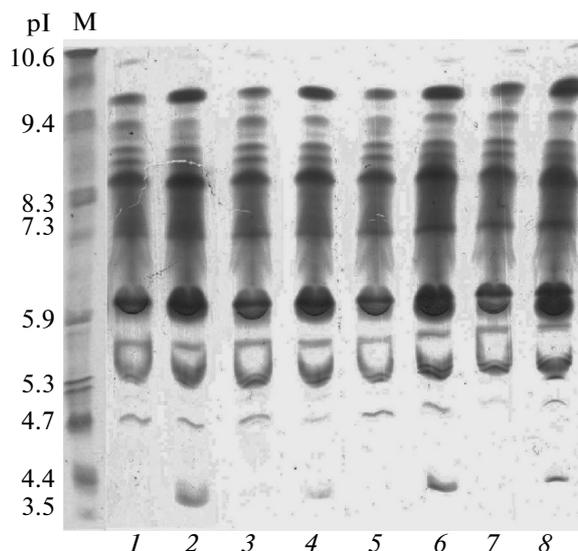
обеспечить оптимальную защиту своих тканей. В наших исследованиях обработка СК индуцировала генерацию АФК на более ранней стадии патогенеза по сравнению с ЖК. Вероятно, усиление образования  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  под действием сигнальных молекул, обнаруживаемое как на эктофитной, так и эндофитной стадиях развития *S. nodorum*, неблагоприятно отражалось на его развитии.

В настоящее время не вызывает сомнения, что АФК важны в защитных реакциях растений на воздействие различных стрессоров, в том числе и патогенов. Так, в клубнях картофеля иммунного сорта при инфицировании возбудителем фитофтороза выявлена генерация  $H_2O_2$ , сопровождающаяся реакцией сверхчувствительности [24], при инфицировании устойчивых растений пшеницы возбудителем бурой ржавчины установлена интенсивная генерация  $O_2^{\cdot-}$  в замыкающих клетках устьиц и в мезофилле листа, подавление которой способствовало росту и развитию патогена в растительных тканях [16].

Важная роль в генерации  $H_2O_2$  и формировании устойчивости растений пшеницы к грибным патогенам принадлежит растительному ферменту оксалатоксидазе [19], секреция которого в апопласт под влиянием СК усиливается [8]. В то же время, если учитывать, что возбудители септориоза способны к синтезу и секреции в растительные ткани щавелевой кислоты, являющейся фактором патогенности [25], то индукция активности данного фермента способствует развитию устойчивости растений.

Особое место в регуляции взаимоотношений растений и патогенов занимают каталазы. Они способствуют усилению вирулентности грибных патогенов за счет снижения концентрации АФК в зоне инфицирования и подавления окислительного взрыва [26]. В наших исследованиях обработка СК и ЖК снижала каталазную активность в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum*, что положительно отражалось на накоплении  $H_2O_2$  и подавлении степени развития патогена.

Жасмоновая кислота и ее циклические предшественники составляют семейство биоактивных оксипептидов, участвующих в регуляции ответа растений на различные стрессы, в том числе на поражение фитофагами и некоторыми микроорганизмами [27]. Защитный эффект ЖК против фитопатогенов обусловлен ее способностью регулировать синтез патоген-индуцируемых белков [9]. В наших исследованиях ЖК индуцировала появление катионной изоформы пероксидазы с  $pI \sim 9.8$ . Учитывая полифункциональность пероксидазы, а также способность изоформы фермента с  $pI \sim 9.8$  сорбироваться на мицелии патогенных грибов [22], можно сказать, что под воздействием ЖК генерация АФК и утилизация их избытка может происходить в процессе лигнификации непосредственно на инфекционных структурах патогена.



**Рис. 3.** Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на изоферментный спектр пероксидаз в листьях пшеницы: 1 – контроль, 2 – инфицирование *S. nodorum*, 3 – обработка СК; 4 – обработка СК + инфицирование *S. nodorum*; 5 – обработка ЖК; 6 – обработка ЖК + инфицирование *S. nodorum*, 7 – обработка смесью СК + ЖК, 8 – обработка смесью СК + ЖК + инфицирование *S. nodorum*, 48 ч после инокуляции. М – расположение маркерных белков в ПААГ;  $pI$  – изоэлектрические точки.

В индукции защитных механизмов определяющим является восприятие сигнала и его распространение по тканям растения, которое происходит при участии сигнальных молекул, таких, как СК и ЖК [1]. На растениях арабидопсиса показано, что СК индуцирует устойчивость против облигатных патогенов, а ЖК – против некротрофных, однако при совместном применении вместо защитного ответа может быть индуцирована восприимчивость, вызванная антагонизмом сигнальных систем [2]. В наших исследованиях обе сигнальные молекулы – СК и ЖК оказывали пролонгированное защитное действие на растения пшеницы при инфицировании *S. nodorum*, индуцируя в них генерацию супероксидного радикала и  $H_2O_2$ . Причем СК оказывала более раннее индуцирующее действие на уровень АФК, чем ЖК. Защитное действие сигнальных молекул против возбудителя септориоза было обусловлено активацией оксалатоксидазы, индукцией анионных и катионных пероксидаз и снижением активности каталазы в период 24–48 ч после инфицирования. Ослабление защитного эффекта под воздействием смеси СК и ЖК на растения пшеницы при инфицировании *S. nodorum*, вероятно, обусловлено как биологическими особенностями гембиотрофного патогена, так и возможным перекрыванием сигнальных путей.

Работа выполнена при поддержке программы АЦВП № 2.1.1/5676, Госконтракта Министерства образования и науки № П-339, ФЦП “Научные и

научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы проект № 16.740.110061.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
2. *Koorneef A., Verhage A., Leon-Reyes A., Snetselaar R., Van Loon, L.C., Pieterse C.M.* // *Plant Signaling and Behavior*. 2008. V. 3. № 8. P. 543–546.
3. *Ayoung L., Kyoungwon C., Sungkuk J., Rakwal R., Iwahashi H., Ganesh K.F., Shim J., Oksoo H.* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004. V. 318. № 3. P. 734–738.
4. *Mur L.A.J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C.* // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. № 1. P. 249–262.
5. *Flors V., Ton J., Van Doorn R., Jakab G., Garsia-Agustin P., Mauch-Mani B.* // *Plant J.* 2008. V. 54. № 1. P. 81–92.
6. *Han S.K., Terrence P.D.* // *Plant Cell.* 2002. V. 14. № 7. P. 1469–1482.
7. *Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Максимов И.В., Хайруллин Р.М.* // *Агрехимия*. 2003. № 12. С. 55–59.
8. *Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Валеев А.Ш., Максимов И.В.* // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2007. Т. 34. № 5. С. 545–550.
9. *Бурханова Г.Ф., Яруллина Л.Г., Максимов И.В.* // *Физиология растений*. 2007. Т. 54. № 1. С. 104–110.
10. *Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Панина Я.С., Чаленко Г.И.* // *Физиология растений*. 2006. Т. 53. № 4. С. 546–553.
11. *Пыжикова Г.В., Карасева Е.В.* // *Сельхоз. биология*. 1985. № 12. С. 112–114.
12. *Vaidyanathan H., Sivakumar P., Chakrabarty R., Thomas G.* // *Plant Sci.* 2003. V. 165. № 6. P. 1411–1418.
13. *Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P.* // *New Phytol.* 2001. V. 151. № 1. P. 185–194.
14. *Caliskan M., Cuming A.C.* // *Plant J.* 1998. V. 15. № 12. P. 165–171.
15. *Vuletic M., Sukalovich V.H.* // *Plant Sci.* 2000. V. 157. № 2. P. 257–263.
16. *Плотникова Л.Я.* // *Физиология растений*. 2009. Т. 56. № 2. С. 200–209.
17. *Плотникова Л.Я.* // *Микол. и фитопатол.* 2009. Т. 43. № 3. С. 63–77.
18. *Лиу Ю., Пан Ц.Х., Ян Х.Р., Лиу Ю.Ю., Хуан В.Д.* // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 6. С. 851–862.
19. *Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И.* Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. Уфа: Гилем, 2006. 232 с.
20. *Трошина Н.Б., Максимов И.В., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б., Черепанова Е.А.* // *Цитология*. 2004. Т. 46. № 11. С. 1001–1005.
21. *Максимов И.В., Валеев А.Ш., Черепанова Е.А., Яруллина Л.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2009. Т. 46. № 4. С. 481–486.
22. *Максимов И.В., Черепанова Е.А., Хайруллин Р.М.* // *Биохимия*. 2003. Т. 68. № 1. С. 131–136.
23. *Морозов Ю.М.* // *Микология и фитопатология*. 1992. Т. 26. № 1. С. 67–75.
24. *Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Валеева Т.А., Озерецковская О.Л.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2008. Т. 44. № 2. С. 236–240.
25. *Liang H., Maynard C.A., Allen R.D., Powell W.A.* // *Plant. Mol. Biol.* 2001. V. 45. № 6. P. 619–629.
26. *Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А.* // *Биохимия*. 2007. Т. 72. № 10. С. 1342–1364.
27. *Ayoung L.* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004. V. 318. № 3. P. 734–738.

## Salicylic and Jasmonic Acids in Regulation of the Proantioxidant State in Wheat Leaves Infected by *Septoria nodorum* Berk.

L. G. Yarullina, N. B. Troshina, E. A. Cherepanova, E. A. Zaikina, and I. V. Maksimov

Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia  
e-mail: yarullina@bk.ru

Received December 9, 2010

**Abstract**—Influence of mediators of the signal systems of salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids and their mixture on reactive oxygen species' (ROS) (superoxide radical  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ ) generation and activity of oxidoreductases (oxalate oxidase, peroxidase and catalase) in leaves of wheat *Triticum aestivum* L. infected by Septoria leaf blotch pathogen *Septoria nodorum* Berk. has been studied. Presowing treatment of seeds by SA and JA decreased the development rate of fungus on wheat leaves. SA provided earlier inductive effect on production of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  compared with JA. The protective effect of the salicylic and jasmonic acids against Septoria leaf blotch pathogen was caused by activation of oxalate oxidase, induction of anion and cation peroxidases, and decrease of catalase activity. Ability of compounds to stimulate ROS in the plant tissues can be used as criteria for evaluation of immune-modulating activity of new substances for protection of the plants.