Виділені зразки з колекції генетичних ресурсів конопель зі зближеними строками цвітіння чоловічих і жіночих квіток однодомної фемінізованої матірки, встановлені кореляційні зв'яки між тривалостями цвітіння і дозрівання насіння.

Samples of hemp genetic researches with absence of the staminate monoecious hemp with drawn together periods of flowering of male and female flowers of the monoecious feminized pestillate hemp are given. Correlation communications between flowering and seeds ripening duration are set.

МОЛОДЧЕНКОВА О.О., **АДАМОВСЬКА В.Г.**, **ЛИТВИНЕНКО М.А.**, **ЦІСЕЛЬСЬКА Л.Й.**, **СОЛОМОНОВ Р.В.**, **БЕЗКРОВНА Л.Я.**
Селекційно-генетичний інститут-Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення УААН,
Україна,65036, Одеса, Овідіопольська дорога 3,e-mail:adam@paco.net

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ БІЛКОВО-ФЕРМЕНТНИМ КОМПЛЕКСОМ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІЇ ТА СТІЙКІСТЮ ДО ФУЗАРІОЗУ

Серед факторів, лімітуючих врожай пшениці в степовій зоні України, найбільш шкодочинними є фітозахворювання, зокрема фузаріоз. Селекція стійких до збудників фузаріозу сортів є економічно вигідним та екологічно безпечним напрямком боротьби з фітозахворюванням. Успіх селекційної роботи на стійкість до фузаріозу залежить від ефективності методів визначення реакції різних генотипів на вторгнення патогену та формування рослиною механізмів стійкості на різних етапах взаємодії рослини та патогену. Припускається кількісний характер успадкування та домінантна полігенна система генетичного контролю ознаки стійкості до фузаріозу [1]. Рівень стійкості рослин до фузаріозу, а також механізми її формування забезпечуються багатьма біохімічними показниками, які відповідають за збереження життєздатності та перебудову метаболізму рослин в умовах патогенезу. В адаптаційних процесах рослин при зараженні патогенами важливу роль відіграють такі реакції, як утворення патогенезозалежних білків, збільшення рівня фенолів, активація ферментів (протеаз, фенілаланінаміакліази), зміни в окислювально-відновних процесах [2]. Вважається, що у формуванні механізмів стійкості до фітозахворювань беруть участь інгібітори протеїназ та лектини. Встановлено, що ці білки захищають рослини від ураження патогенами і що їх вміст у насінні генетично детермінований [3,4].

Метою даної роботи було встановлення взаємозв'язку між активністю інгібітора трипсину, лектинів, фенілаланінаміакліази (ФАЛ), нейтральної протеази в генотипах пшениці, які достовірно відрізнялися за стійкістю до фузаріозу (при зараженні відповідними збудниками) та стійкістю до фузаріозної інфекції та відбір більш специфічних показників стійкості для подальшого їх використання для оцінки селекційного матеріалу.

Дослідження проводили на 13 генотипах пшениці, які достовірно відрізнялися за стійкістю до захворювання. Стійкі генотипи:лінія 5/20-91, 7 генотипів, створених від схрещування сорту ярої пшениці Superb з чистими лініями озимої пшениці, що мають гени стійкості до фузаріозу. Сприйнятливі генотипи: Харківська 26, Елегія Миронівська, Рання 73, Дніпрянка, Колективна 3.

Рослини вирощували при 24°С на воді (контроль) і на інфекційному фоні (сильнопатогенний штам К90 Fusarium graminearum).

Активність інгібітора трипсину визначали за зменшенням швидкості гідролізу синтетичного субстрату БАПА ферментом у присутності інгібітора, котрий екстрагували з контрольного та інфікованого зерна на 2 добу пророщування[5].

Лектини виділяли з зародків зерна, замоченого у воді на ніч (контроль) та в суспензії патогену. Активність лектинів визначали за їх здатністю агглютинувати трипсинізовані еритроцити білих пацюків (при кімнатній температурі). За лектинову активність брали величину, зворотню мінімальній концентрації білка, при якій відбувається агглютинація еритроцитів (мкг білка/мл)$^{-1}$. Еритроцити одержували та трипсинізували за методикою [6].

ФАЛ екстрагували з 4-добових проростків, вирощених на воді (контроль) та на суспензії патогену. Активність ФАЛ визначали за методичними принципами, які використані Цукерманом у нашій модифікації. Активність ФАЛ виражали відношенням одиниць екстинції на мг білка (ΔЕ/мг) [7].

Нейтральну протеазу екстрагували з надземної частини 6-добових проростків пшениці, вирощених на воді та суспензії патогену. Активність нейтральної протеази визначали за допомогою реактиву Фоліна - за приростом в надосадовій рідині продуктів гідролізу 2% казеїну (pH 6,0) , які не висаджувалися 5% ТХУ. Активність ферменту виражали в нанокаталах на 1г ліофільно висушеної маси проростків [8].

Вміст білка в екстрактах визначали за методом Лоурі.

Досліди проводили в 2-3-кратній для кожного сорту біологічній та 4-кратній аналітичній повторності.

Один із важливих захисних механізмів злакових культур при фузаріозі - зростання вмісту білків, які інактивують ферменти, виділені патогеном. До таких білків відносяться інгібітори протеаз. Генетичний аналіз показника інгібітора трипсину (ІТ) в насінні озимої пшениці, проведений шляхом схрещування контрастних за вмістом ІТ сортів, показав, що коефіцієнт успадкування ознаки досить високий (H^2=0.81-0.91). Була встановлений тісний кореляційний зв’язок між вмістом ІТ та стійкістю генотипів озимої пшениці до фузаріозу (r=0.87)[9]. Вивчення рівня інгібіторів трипсину (ІТ) в насінні генотипів пшениці, отриманих шляхом схрещування сорту ярої пшениці Superb з лініями озимої пшениці, що мають гени стійкості до фузаріозу, при зараженні збудниками фузаріозу показало, що найбільш високим рівнем індукції цього показника під дією патогену відрізнялася лінія 5/20-91 (збільшення активності ІТ в 2,45 раза відносно контролю). В гібридах, отриманих від схрещування сорту ярої пшениці Superb з лініями 5/20-91 та 1/74-91, середній показник активації ІТ сягав 111% до контролю. У сприйнятливих генотипах пшениці середній показник індукції ІТ на фоні патогену був 103% від контролю. За результати досліджень був встановлений позитивний кореляційний зв’язок (r= 0,57 при p=0,01) між активністю інгібітора трипсину в насінні, вирощеному на інфекційному фоні, та показниками фітопатологичної оцінки, які характеризують стійкість генотипів до фузаріозу. Отримані результати підтвердили наші попередні дані про суттєвіше збільшення рівня ІТ у стійких генотипів у порівнянні зі сприйнятливими [9], але рівень відмінності активності ІТ на інфекційному фоні між досліджуваними гібридами та сприйнятливими генотипами пшениці був незначний.

У відповідних реакціях рослин при патогенезі беруть участь лектини - білки зі специфічними біологічними властивостями, які зворотньо і вибірково зв’язують вуглеводи, не викликаючи їх хімічного перетворення. Дослідження активності лектинів зародків пшениці на інфекційному фоні виявило, що стійкі генотипи пшениці відрізнялися більш низькою активністю лектинів за дії патогену в порівнянні зі сприйнятливими генотипами. Так, активність лектинів при інфікуванні лінії 5/20-91 складала 21% від контролю. Середній рівень активності лектинів зародків пшениці на інфекційному фоні у вивчених стійких гібридах складала 57,1% , хоч у одного з гібридів - F6(Superb x 1/74-91) активність лектинів складала 17,2% відносно контролю. У сприйнятливих до фузаріозу генотипів пшениці середній рівень активності лектинів складав 98% від контролю. За результати досліджень був встановлений позитивний кореляційний зв’язок (r=0,70 при p=0,01) між активністю лектинів в насінні,

вирощеному на інфекційному фоні, та показниками фітопатологичної оцінки, які характеризують стійкість генотипів до фузаріозу. Ці дані свідчать про участь лектинів зародків у взаємостосунках рослина - патоген при патогенезі, що призводить до порушення метаболізму та, у підсумку, синтезу або пригніченню синтезу лектинів, і можливість використання цього показника при відборах стійких генотипів пшениці.

Адаптаційні можливості рослин значною мірою визначаються рівнем стабільності структури та кінетичних здатностей ферментів. Зокрема відомо, що протеолітичні ферменти беруть участь у формуванні стійкості до фітозахворювань [10]. Визначення активності нейтральної протеази в надземній частині проростків досліджуваних генотипів пшениці показав, що у лінії 5/20-91 рівень активності ферменту при дії фузаріозної інфекції зростав в 1,56 раза в порівнянні з контролем, а в гібридах активність нейтральної протеази практично не змінювалася. У сприйнятливих генотипів пшениці середній рівень активності нейтральної протеази складав 86% відносно контролю, але у деяких генотипів (Елегія Міронівська та Колективна 3) вона залишалася практично на рівні контролю. Ці результати свідчать про наявність тенденції до збільшення активності нейтральної протеази на інфекційном фоні у стійких генотипів пшениці в порівнянні зі сприйнятливими, але використовувати для добору в селекції цей показник неможливо.

Посилення утворення фенольних сполук та процесів лігніфікації при інфікуванні рослин патогенами в багатьох випадках пов'язане зі зростанням активності ключового ферменту фенольного метаболізму – фенілаланінаміакліази. ФАЛ бере участь в утворенні попередників саліцилової кислоти, фітоалексинів, мономерів лігнину, які зміцнюють механічні та хімічні бар'єри клітин рослин. Припускають, що підвищення стійкості рослин можна спробувати досягти шляхом посилення активності ферментів фенольного метаболізму, таких як ФАЛ [11]. Проведене визначення активності ФАЛ в надземній частині та коріннях проростків при інфікуванні збудниками фузаріозу показало, що у стійкої до фузаріозу лінії 5/20-91 активність ферменту зростала в 1,28 раза в надземній частині проростків та в 1,56 – у коріннях. Активність сумарної індукції ФАЛ складала 160 % відносно контролю. У стійких гібридів пшениці середній рівень індукції ФАЛ в надземній частині проростків складав 125,9%, а в коріннях - 139,5%, але серед гібридів зустрічалися генотипи, у яких спостерігалася різнохарактерна картина зміни активності ферменту в надземній частині та коріннях проростків. Сумарна активність ферменту на інфекційному фоні у стійких генотипів складала 119,7% відносно контролю. У сприйнятливих генотипів пшениці спостерігали зменшення активності ферменту на інфекційному фоні як в надземній частині, так і в коріннях проростків, за винятком надземної частини проростків сорту Дніпрянка. Сумарна активність ФАЛ у сприйнятливих генотипів була в 1,5 раза нижче в порівнянні з сумарною активністю стійких генотипів (середня активність складала 81% відносно контролю). Встановлений позитивний кореляційний зв'язок ($r=0,77$ при $p=0,03$) між сумарною активністю ФАЛ в проростках, вирощених на інфекційному фоні, та показниками фітопатологічної оцінки. З отриманих результатів можна зробити висновок, що визначення сумарної активності ФАЛ проростків на інфекційному фоні є більш інформативним для оцінки селекційного матеріалу.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлені диференційовані зміни вивчених біохімічних показників у різних за стійкістю генотипів пшениці в залежності від стійкості до фузаріозу, що свідчить про їх участь в формуванні захисних реакцій рослин озимої пшениці при зараженні збудниками фузаріозу. Найбільш достовірні відмінності між даними генотипами, які відрізнялися за стійкістю до фузаріозу, були отримані за зміною активності лектинів у зародках пшениці при інфікуванні збудниками фузаріозу та сумарної активності ФАЛ в інфікованих проростках.

Література

1. *Євтушенко М.Д., Лісовий М.П., Пантелєєв В.К., Слюсаренко О.М.* Імунітете рослин. – К.:Колобіг, 2004. – 304 с.
2. *Ильинская Л.И., Васюкова Н.И., Озерецковская О.А.* Биохимические аспекты индуцированной устойчивости и восприимчивости растений //Итоги науки и техники. Серия Защита растений. - М: ВИНИТИ, 1991.С. 4- 78.
3. *Мосолов В.В.* Ингибиторы протеолитических ферментов как защитные белки растений / Фитонциды.Бактериальные болезни растений: Материалы конф.Львов. 1990. С.50-51.
4. *Хайруллин Р.М., Шакирова Ф.М., Максимов И.В.,Безрукова М.В., Ямалеев А.М.* Изучение содержания лектина, абсцизовой и индолилуксусной кислот в растениях пшеницы, инфицированных Septoria S. nodorum. Berk//Физиология и биохимия культурных растений. 1993. Т. 25. N 2. С. 138-144.
5. *Левицкий А.П.* Методы определения ингибиторов трипсина. Сб.научн.тр.“Биохимические методы исследо-вания селекционного материала”. – Одесса:ВСГИ. 1979. – Т.15. – С. 68-72.
6. *Луцик М.Д.,Панасюк Е.Н., Луцик А.Д.* Лектины. -Львов:Вища школа, 1981.-155 с.
7. *Zucker M*. Induction of phenylalanine deaminase by light its regulation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue // Plant Physiology/ - 1965. - № 5. - V. 40. – P. 779-784.
8. *Вовчук С.В*. Определение активности протеолитических ферментов в зерне злаковых культур// Биохимические методы исследования селекционного материала. Тр.ВСГИ. – Одесса: ВСГИ, 1979. – 15. – С.59-67.
9. *Адамовская В.Г., Клечковская Е.А., Молодченкова О.О., Вовчук С.В.* Изменение протеиназно-ингибитор- ной системы озимой пшеницы под действием салициловой кислоты и Fusarium // Физиология растений. 2000. Т.47. N 2. С. 210-215.
10. *Серова З.Я., Юшко Л.С.,* Подчуфарова Г.М. Функции белков в фитопатогенезе. – Минск.; Навука і техніка. 1992. – 34-45.
11. *Fellegrini L.* La phenylalanin ammoniac-lyase (PAL) et I’Omethyltransferase (OMT) de classe II du Tabac, des enzymes du metabolisme phenoligue impliquees dans la defense antimicrobienne: clonage des cDNA et etude de la regulation spatio-temporelle des genes’//. These de I ‘Universite Louis Pasteur. Strasbourg.France. 1994.

Резюме

Вивчено комплекс біохімічних показників, що відповідають за стійкість до фітозахворювань (активність інгібітору трипсина, лектинів, фенілаланінаміакліази, нейтральної протеази), в генотипах пшениці, які достовірно відрізнялися за стійкістю до фузаріозу. Знайдені більш специфічні для пшениці біохімічні показники, за допомогою яких можливо оцінювати генотипи пшениці на стійкість до фузаріозу.

Изучен комплекс биохимических показателей, отвечающих за устойчивость к фитозаболеваниям (активность ингибитора трипсина, лектинов, фенилаланинаммиаклиазы, нейтральной протеазы), в генотипах пшеницы, достоверно различающихся по устойчивости к фузариозу. Найдены более специфичные для пшеницы биохимические показатели, с помощью которых можно проводить оценку генотипов пшеницы на устойчивость к фузариозу.

The complex of biochemical indexes responsible for resistance to phytodiseases (trypsin inhibitors’ activity, lectins’ activity, phenylalanineammonialyase activiy, neutral protease activity) in the wheat genotypes which reliable differed for resistance to Fusarium is studied. More specific for a wheat biochemical indexes by which it is possible to conduct the estimation of wheat genotypes‘ resistance to Fusarium spp. was found.