

Омарова Г.Х., Рсалиев А.С., Пахратдинова Ж.У., Амирханова Н.Т., Ыскакова Г.Ш.

КҮРІШ ПИРИКУЛЯРИОЗЫНЫҢ ІНДЕТТІ ОРТАСЫН ҚҰРУ ҮШІН ТИІМДІ ӘДІСТІ ТАҢДАУ

Мақалада күріштің селекциялық материалдарының пирикуляриоз ауруына төзімділігін фитопатологиялық бағалау және ауруға төзімді күріш сорттары мен линияларын сұрыптау үшін *Pyricularia oryzae* қоздырғышының індетті ортасын құрудың әртүрлі әдістерін қолдану нәтижелері көрсетілді және талданды. Саңырауқұлақ конидиясының суспензиясын фильтрлі қағазға сіндіре отырып, күріш жапырақ қиындыларына жұқтыру және патоген конидиясының суспензиясын күріш жапырақ қиындыларына тамшылата отырып жұқтыру індетті ортаны құрудағы ең тиімді зертханалық әдістер болып есептелді.

Кілт сөздер: күріш, пирикуляриоз, әдіс, індетті орта, *Pyricularia oryzae*.

Omarova G.Kh., Rsaliyev A.S., Pakhratdinova Z.U., Amirkhanova N.T., Iskakova G.Sh.

SELECTION OF EFFECTIVE METHOD FOR THE CREATION INFECTION BACKGROUND RICE BLAST

The article presents and discusses the results of the application of different methods of producing infection background *Pyricularia oryzae* phytopathologic assessing the sustainability of the breeding materials for rice blast disease and the selection of resistant varieties and lines of rice. Experimentally found that the most effective method of creating laboratory infection background is the inoculation of pieces of leaves rice plants with filter paper soaked in conidial suspension of the fungus and the inoculation of pieces of leaves rice plants drops conidial suspension of the pathogen.

Keywords: rice, blast disease, method, infection background, *Pyricularia oryzae*.

УДК 575.127:58.084.5

Омирбекова Н.Ж., Жусупова А.И., Жунусбаева Ж.К., Асканбаева Б.Н.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНАХ *BRACHYPODIUM DISTACHYON* И МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ БИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Аннотация

В данной работе показаны некоторые результаты сравнительного анализа активности антиоксидантных ферментов (ксантиндегидрогеназа, альдегидоксидаза), выполняющих важные функции в процессах адаптации растений в условиях биотического стресса, а именно при заражении *Puccinia recondita*, опасным патогеном мягкой пшеницы, полученные впервые в Казахстане при применении *Brachypodium distachyon* в качестве модельного объекта.

Ключевые слова: *Brachypodium distachyon*, мягкая пшеница, бурая ржавчина, ксантиндегидрогеназа, альдегидоксидаза.

Введение

Мягкая пшеница является одной из наиболее экономически значимых сельскохозяйственных культур в Казахстане, признанном мировом экспортере зерна, значительные колебания в производстве которого, опосредованы абиотическими и биотическими стрессами. Одними из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний злаковых культур являются ржавчинные болезни: *Puccinia recondita* – бурая листовая, *Puccinia graminis* – стеблевая, *Puccinia striiformis* – желтая. Создание устойчивых к патогенам сортов культурных растений методами селекции продолжительно по времени, в результате эволюция патогенов и обгоняет возможности селекционеров, а получение устойчивых сортов растений опаздывает с внедрением в производство. В связи с этим одной из первоочередных проблем сельского хозяйства и современной биологии является выявление более мобильных методов и путей формирования устойчивости растений к патогенам [1, 2].

Модельный объект *Arabidopsis* предоставил уникальные возможности для изучения ключевых биологических особенностей биологии растений, в том числе устойчивости к болезням. Однако грибы ржавчины рода *Puccinia* не способны заразить *Arabidopsis* и это не дало возможность использовать *Arabidopsis* в исследовании ржавчины. *Brachypodium distachyon* (коротконожка пурпурная), относящаяся к подсемейству *Pooideae*, была рекомендована в качестве новой модельной системы для умеренных злаков. *Brachypodium* имеет ряд преимуществ для понимания генетической, клеточной и молекулярной биологии умеренных злаков, в том числе и потому, что она является единственным одно-летним злаком, филогенетически наиболее близким к сельскохозяйственно-значимым злакам (пшеница, ячмень, рис) и может быть заражена различными формами ржавчины [3, 4].

В настоящее время проводятся исследования по изучению влияния стрессовых факторов окружающей среды на устойчивость и восприимчивость к стеблевой ржавчине у дикого злака *Brachypodium*, которые помогут расшифровать генетическую основу имеющихся механизмов ответа с применением рекомбинантных инбредных популяций от родительских форм с разным уровнем сопротивления. В частности, были получены индуцированные мутанты с нарушенной устойчивостью к стеблевой ржавчине, которые помогут познать молекулярную биологию сопротивления и восприимчивости растений к ржавчине [5]. Также выявлены геномные регионы *Brachypodium*, связанные с количественной устойчивостью к ржавчине *Puccinia brachypodii*. Инбредные линии Bd3-1 и Bd1-1, отличающиеся по уровню устойчивости к *P. brachypodii*, были скрещены для получения поколения F₂. Три локуса количественных признаков, ответственных за устойчивость к стеблевой ржавчине были выявлены на хромосомах 2, 3 и 4. Устойчивость к ржавчине контролируется несколькими локусами [6]. Было проведено первичное определение районов генома, ассоциированных с устойчивостью к ржавчине в двух инбредных линиях Bd3-1 (устойчивая) и Bd1-1 (чувствительная), с моделированием генов, участвующих в различных сетях метаболизма, таких как гликолиз, обмен аминокислот и азота, которые могут быть далее использованы в трансляционной геномике злаковых [7]. Генетические основы устойчивости *Brachypodium distachyon* к стеблевой ржавчине пшеницы были изучены методом картирования при скрещивании устойчивой и неустойчивой форм в F₄₋₅. Было выявлено влияние одного доминантного и одного рецессивного генов, один из которых, как ожидается, локализован в хромосоме 3 [8].

В Казахстане *Brachypodium distachyon* в качестве модельного объекта используется впервые для изучения активности антиоксидантных ферментов (ксантиндегидрогеназа,

альдегидоксидаза), существенных в процессах адаптации растений в условиях биотического стресса, вызванного патогенами, в их числе и листовой ржавчиной, что зачастую приводит к накоплению активных форм кислорода. Ксантиндегидрогеназа – сильный антиоксидант, снижающий уровень окислительного стресса в клетках. Ксантиндегидрогеназу рассматривают как фермент, имеющий физиологические функции в метаболизме активных форм кислорода. Так, одновременное продуцирование активных форм кислорода и увеличение активности ксантиндегидрогеназы наблюдали при взаимодействии «растение-патоген». Известно, что интенсивность деградации пуринов, контролируемая ксантин-дегидрогеназой, повышается в период инфекции пшеницы при поражении грибом *Puccinia recondita*. В свою очередь, альдегидоксидаза вовлечена в путь биосинтеза абсцизовой и индолилуксусной кислот в растениях. Этот фермент привлекает особое внимание, поскольку абсцизовая кислота является многофункциональным фитогормоном, играющим важную роль в предотвращении предуборочного прорастания семян и регуляции транспирации, также установлена прямая корреляция аккумуляции абсцизовой кислоты с возрастающим образованием активных форм кислорода в растительных клетках; индолилуксусная кислота же поддерживает постоянный апикальный рост и регулирует фототропическое и гравитропическое поведение растений. В связи с тем, что альдегидоксидаза обладает широкой субстратной специфичностью, нельзя исключать ее участие и в других реакциях метаболизма, например, реакции детоксификации и реакции ответа на воздействие патогена [9, 10].

Материалы и методы

Объекты исследования – два сорта яровой пшеницы местной селекции (Казахстанская раннеспелая, Казахстанская 19) и *Brachypodium distachyon* (21 линия), семена которого были предоставлены Центром биоресурсов RIKEN BRC (Япония). Основанием для выбора сортов пшеницы являлась степень устойчивости или чувствительности к листовой ржавчине. По результатам оценок лаборатории иммунитета и защиты растений КазНИИ земледелия и растениеводства и НИИ проблем биологической безопасности РК сорт Казахстанская 19 проявляет устойчивость к бурой (14%) и желтой ржавчинам, тогда как сорт Казахстанская раннеспелая поражается бурой ржавчиной до 40 %. Оба сорта отвечают требованиям ГОСТа. В фазе роста двух листьев, растения опытного варианта подвергали инокуляции урединиоспорами, контролем служили необработанные растения. Инокулят - казахстанская популяция спор гриба *Puccinia recondita* предоставлена Научно-исследовательским институтом проблем биологической безопасности страны. Симптомы заражения у растений регистрировали на 7-е сутки. Они проявлялись на верхней стороне листьев, реже на листовых влагалищах в виде бурых пустул (уредилий) диаметром 0,5-2,0 мм.

Определение активностей ксантиндегидрогеназы и альдегидоксидазы проводили методом нативного гель-электрофореза. Листья экстрагировали (в соотношении 1:4) экстракционным буфером, содержащим в себе 250 мМ Трис-НСl (рН = 8,48), 1 мМ ЭДТА, 14 мМ L-глутатион, 4 мМ дитиотрейтол, 5 мМ L-цистеин, 0,05 мМ раствор $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 0,001 мМ пепстатин и 250 мМ раствор сахарозы. Экстракты центрифугировали при 14000 оборотах в минуту при 4⁰С в течение 20 минут. Супернатанты полученные из листьев, сначала прогревали при 60⁰С в течение 2 минут и только после повторного центрифугирования в течение 5 минут при тех же условиях в охлаждаемой центрифуге использовали для анализа. Активность ферментов определяли в 7,5% полиакриламидном геле после фракционирования белков методом нативного гельэлектрофореза по стандартной методике (Laemmli, 1970). По завершении электрофореза полученные гели снимали со стекол и обрабатывали реакционной смесью, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН=8,48), 3,4 мМ 3(4,5-диметилтиазолил-2)2,5-

дифенилтетразолий бромид и 0,1 мМ феназинметосульфат. В качестве субстрата для ксантиндегидрогеназы служили 1,5 мМ гипоксантин и 0,5 мМ ксантин, в качестве субстрата для альдегидоксидазы – 2,5 мМ ванилин, 0,5 мМ индол-3-альдегид. Для визуализации активности ферментов гели в течение 20-30 минут инкубировали в указанной выше смеси в темноте на качалке при температуре 37⁰С. Активности ферментов ксантиндегидрогеназы и альдегидоксидазы оценивали по относительной интенсивности окрашивания формазановых полос с помощью обработки программой ImageJ цифровых изображений гелей, полученных на сканере Epson Perfection V750 PRO.

Результаты исследований и обсуждение результатов

Изучение активности ксантиндегидрогеназы и альдегидоксидазы, как показателей степени развития окислительного стресса и признака устойчивости исследуемых растений в условиях биотического стресса показало следующие результаты.

На рисунке 1 представлены данные определения активности ксантиндегидрогеназы, где 0 – это контроль, а P – патоген. Относительные интенсивности относятся к соответствующим формазановым полосам ксантиндегидрогеназы.

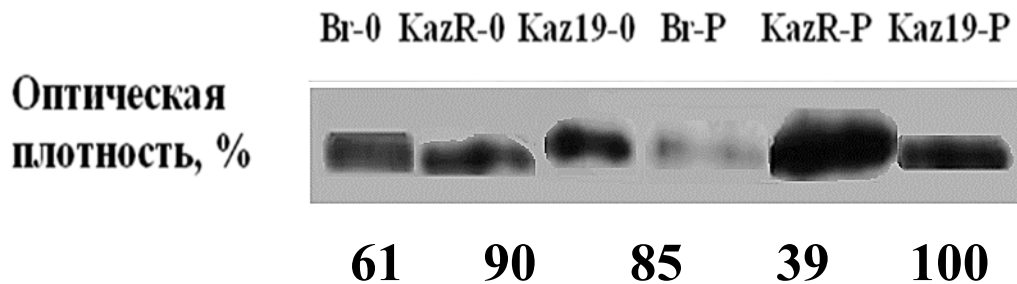


Рисунок 1 – Активность ксантиндегидрогеназы в вегетативных органах мягкой пшеницы и *Brachypodium distachyon*

Как видно из рисунка 1 активность ксантиндегидрогеназы в листьях сортов пшеницы Казахстанская раннеспелая и Казахстанская 19 после поражения патогеном бурой ржавчиной повысилась незначительно (на 10 и 5 % относительно контроля). Активность фермента у галофита *Brachypodium distachyon* снизилась на 36 % относительно контроля.

Ингибирование активности ксантиндегидрогеназы *Brachypodium distachyon* может быть связано с увеличением устойчивости клеток к патогенам. Соответственно полученным нами данным можно сделать вывод, что ксантиндегидрогеназа играет важную роль в процессах адаптации растений к патогену.

На рисунке 2 представлены данные определения активности альдегидоксидазы, где 0 – это контроль, а P – патоген. Относительные интенсивности относятся к соответствующим формазановым полосам альдегидоксидазы.

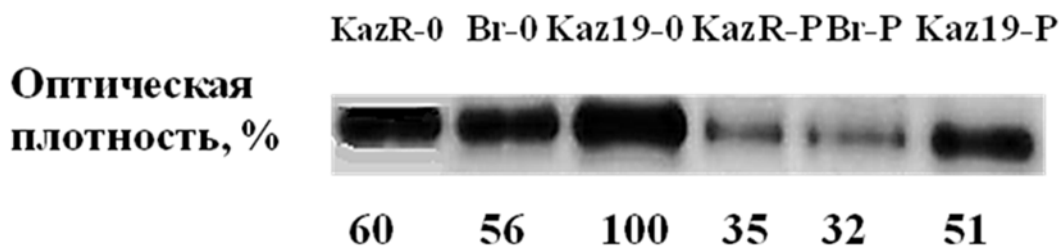


Рисунок 2 – Активность альдегидоксидазы в вегетативных органах мягкой пшеницы и *Brachypodium distachyon*

Как видно из рисунка 2 активность альдегидоксидазы в листьях сортов пшеницы Казахстанская раннеспелая и Казахстанская 19 при заражении патогеном бурой ржавчиной показала уменьшение активности фермента на 41 и 49 % относительно контроля, соответственно, тогда как у *Brachypodium* снизилась на 42 %. На основе полученных результатов можно сделать вывод о важной роли альдегидоксидазы в процессах адаптации растений к биотическому стрессу.

Выводы

Изучение влияния биотического стресса, который вызван патогеном *Puccinia recondita* у *Brachypodium distachyon* на активность ферментов окислительного стресса ксантиндегидрогеназы и альдегидоксидазы показало отрицательную корреляцию при инфицировании на уровне 36 % для ксантиндегидрогеназы и 42 % для альдегидоксидазы относительно контроля.

Работа выполнена при поддержке грантового финансирования научных исследований МОН РК, в рамках проекта «Внедрение нового модельного объекта *Brachypodium distachyon* L. в селекционную практику для повышения устойчивости злаковых культур к биотическим факторам среды».

Литература

1 *Абиев С.А.* Ржавчинные грибы злаковых растений Казахстана. - Алматы: НИЦ «Гылым», 2002. - 296 с.

2 *Boyd L.A., Ridout Ch., O'Sullivan D.M., Leach J.E., Leung H.* Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture // Trends in Genetics. - 2013. - Vol. 29, Issue 4. - P. 233-240.

3 *Peraldi A., Goddard R., Nicholson P.* *Brachypodium distachyon* provides insights into plant trade-offs between growth and stress tolerance // ISB news report. - 2015. - P. 6-10.

4 *Ayliffe M., Singh D, Park R, Moscou M., Pryor T.* Infection of *Brachypodium distachyon* with selected grass rust pathogens // Mol Plant Microbe Interact. - 2013. - Vol. 26, Issue 8. - P. 946-957.

5 *Garvin D.F.* Investigating rust resistance with the model grass *Brachypodium*. 2011. Proceedings of the 2011 Borlaug Global Rust Initiative Technical Workshop. - 2011. - P. 88-91.

6 *Barbieri M., Marcel T.C., Niks R.E., Francia E., Pasquariello M., Mazzamurro V., Garvin D.F., Pecchioni N.* QTLs for resistance to the false brome rust *Puccinia brachypodii* in the model grass *Brachypodium distachyon* L. // Genome. - 2012. - Vol. 55. - P. 152-163.

7 *Mazzamurro V., Marcel T.C., Milc J., Francia E., Roncaglia E., Malagoli G., Biccato S., Tagliafico E., Pecchioni N.* Transcriptome analysis in the interaction *Brachypodium*. – *Puccinia brachypodii*. 1st International *Brachypodium* Conference. - Italy. - 2013. - P. 73.

8 *Bettgenhaeuser J., Gardiner M., Opanowicz M., Hubbard A., Bayles R., Doonan J., Wulff B.B.H., Moscou M.J.* Deciphering the genetic basis of wheat stripe rust resistance in *Brachypodium distachyon*. 1st International *Brachypodium* Conference. - Italy. - 2013. - P. 76.

9 *Taylor N.J., Cowan A.K.* Xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase impact plant hormone homeostasis and affect fruit size in 'Hass' avocado // J. Plant Res. - 2004. - Vol. 117, Issue 2. - P. 121-130.

10 The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid // Plant J. - 2005. - Vol. 42. - P. 862-876

Омирбекова Н.Ж., Жусупова А.И., Жунусбаева Ж.К., Асканбаева Б.Н.

БИОТИКАЛЫҚ СТРЕСС ЖАҒДАЙЫНДА *BRACHYPODIUM DISTACHYON* ЖӘНЕ
ЖҰМСАҚ БИДАЙДЫҢ ВЕГЕТАТИВТІ МҮШЕЛЕРІНДЕГІ АНТИОКСИДАНТТЫ
ФЕРМЕНТТЕР АКТИВТІЛІГІН САЛЫСТЫРМАЛЫ АНЫҚТАУ

Бұл жұмыста жұмсақ бидайдың қауіпті патогені *Puccinia recondita*-мен зақымданған жағдайда өсімдіктердің бейімделу үдерістерінде белсенді қызмет атқаратын антиоксидантты ферменттердің (ксантиндегидрогеназа, альдегидоксидаза) белсенділіктерін салыстырмалы талдаудың кейбір нәтижелері көрсетілген.

Қазақстанда *Brachypodium distachyon* үлгілі нысан ретінде алғаш рет қолданысқа ие болған.

Кілт сөздер: *Brachypodium distachyon*, жұмсақ бидай, қоңыр тат.

Omirkbekova N.Zh., Zhussupova A.I., Zhunusbayeva Zh.K., Askanbayeva B.N.

COMPARATIVE STUDY OF ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY
IN VEGETATIVE ORGANS OF *BRACHYPODIUM DISTACHYON* AND SOFT WHEAT
UNDER THE ACTION OF BIOTIC STRESS

This paper shows some results of a comparative analysis of the activity of antioxidant enzymes (xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase), performing an important function in the process of adaptation of plants under biotic stress, namely infection by *Puccinia recondita*, significant wheat pathogen, obtained for the first time in Kazakhstan using *Brachypodium distachyon* as a model object.

Key words: *Brachypodium distachyon*, soft wheat, leaf rust, xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase.

УДК 631.8:635.1/.8

Раисов Б.О., Тастанбекова Г.Р., Мурзабаев Б.А.

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова (Шымкент),
Юго-Западный научно-исследовательский институт животноводства и
растениеводства (Шымкент),
Южно-Казахстанская областная инспектура по сортоиспытанию
сельскохозяйственных культур (Шымкент)

НОРМЫ ВНЕСЕНИЯ УДОБРЕНИЙ ПОД ТОМАТЫ В УСЛОВИЯХ
ЮЖНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Аннотация

В статье приводятся результаты многолетних исследований по нормам внесения удобрений под томаты. Установлены наиболее оптимальные нормы внесения минеральных удобрений под томаты сорта «Лучезарный» для условий темных сероземов Южного Казахстана.

Ключевые слова: норма, томат, продуктивность, удобрения, химический состав.