

**ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСКОПІЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ  
КАЛОЗИ У ВИВЧЕННІ РЕАКЦІЙ СТРЕТОЛЕРАНТНОСТІ  
ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЗА ПАТОГЕНЕЗУ**

**О. П. БОБОШКО**, аспірант\*

**О. О. ПАНЮТА**, кандидат біологічних наук, доцент

**Н. Ю. ТАРАН**, доктор біологічних наук, професор

**В. І. ЄМЕЛЬЯНОВ**, кандидат біологічних наук

*КНУ імені Тараса Шевченка ННЦ “Інститут біології”*

E-mail: boboshko.elena@mail.ru

***Анотація.** Розглянуто захисні функції калози, як механічного бар’єру, що утворюється рослинними клітинами у відповідь на патогенез. Виявлено концентраційну залежність наявності патогенів та характер відкладання калози у рослинах пшениці різних за стійкістю сортів. Методом флуоресцентної мікроскопії досліджена локалізація калози в клітинних стінках епідерми листків проростків пшениці за інокуляції збудником церкоспорельозу (очкової плямистості). Виявлено відмінності у інтенсивності та характері відкладання калози у клітинах проростків пшениці двох різних за стійкістю сортів за використання різних концентрацій інокулюма.*

***Ключові слова:** калоза, пшениця, мікроскопічні методи, суспензія конідій, *Pseudocercospora herpotrichoides*, патогенез*

Однією з перших неспецифічних захисних реакцій рослинних клітин на дію біотичних та абіотичних стресорів є укріплення клітинних стінок за рахунок відкладання  $\beta$ -1,3-глюкану – калози, що посилює бар’єрні властивості клітин. Під впливом фітопатогенів (грибів і бактерій) відкладання калози індукується у багатьох видів рослин. Проте значення накопичення калози, як складової мультикомпонентної реакції-відповіді рослини на вторгнення патогенів досі обговорюється, не дивлячись на те, що ця захисна реакція вивчається на клітинному рівні вже понад 150 років [2, 7].

Вперше калозу знайдено у ситоподібних клітинах флоєми, пилкових

---

\*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор Н. Ю. Таран

зернах і трубках. Для її виявлення використали два цитохімічні методи, які базуються на визначенні флуоресценції калози при зв'язуванні з аніліновим блакитним та забарвленні резорцином блакитним [8]. Було з'ясовано, що даний глюкан нерозчинний у воді і добре флуоресціює при збудженні у короткохвильовій області спектра. Це дає можливість проводити дослідження його відкладень за допомогою люмінесцентної мікроскопії. Встановлено також, що калоза накопичується як у вегетативних, так і в генеративних органах рослин [5].

Методи на основі фарбування дозволили ідентифікувати калозу в міцелії грибів з родин *Saprolegiaceae*, *Preonosporaceae*, *Mucoraceae*; деяких паразитичних грибів з класу *Oomycetes*; у ризоїдах морських водоростей, гіфах *Laminariaceae* та джгутіках видів *Borago*, *Vitis*, *Ceranium*, *Osmunda* і *Brechnum*; у гаусторіях *Cuscuta*; у корневих волосках; у цистолітах видів *Urticaceae*, *Moraceae*, *Ulmaceae*; в стінках материнської клітини пилку, в основі волосків епідерми та в клітинах паренхіми; у порах молодих трахеїд – провідного елемента ксилеми; у молочниках *Allium cepa* L. і *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.; в ендодермі *Equisetaceae* і *Filicineae*; у пилку та стінках пилкових трубок [7].

Також було встановлено, що калоза бере участь у міжклітинному водному транспорті, рості та диференціації клітин, у формуванні механічного захисного бар'єру при біотичному та абіотичному стресі [7].

Вікладання перших гран калози у рослинних тканинах різних видів рослин варіює від декількох хвилин до кількох годин з моменту їх взаємодії з індуктором [12, 13]. Вже через 20 хвилин після розпізнавання рецепторами плазматичної мембрани еліситорів патогену в клітинах виявляються перші вкраплення полімеру, який накопичується на зовнішній поверхні плазматичної мембрани як потовщення клітинної стінки та має вигляд невеликих пластин або гранул. Найбільшу кількість калози виявили у корені на відстані 0,5 см від верхівки, а також у ситоподібних пластинках провідного елемента флоєми. Останнє дозволяє рослині регулювати споживання мінералів під час стресу і запобігати витоку асимілятів [4].

Калозу ідентифікують методом фарбування аніліновим блакитним [7] з наступним розглядом матеріалу у флуоресцентному мікроскопі за наявності УФ фільтрів [11], або шляхом знебарвлення рослинних тканин у поєднанні з флуоресцентними білками чи флуоресцентними барвниками, які специфічні для різних клітинних органел і компартментів [14].

В останні роки було запропоновано кілька методів кількісного визначення калози. Вони передбачають оцінку інтенсивності люмінесценції даного глюкану шляхом підрахунку пікселів у білих плямах на цифрових фотографіях або розрахунку кількості відкладень по відношенню до загального числа пікселів. Для цього використовують програми Photoshop [15], а також наукове програмне забезпечення ImageJ [10], що дозволяє проводити автоматизований аналіз за допомогою бази ACAPELLA [16]. Застосування системи super-resolution при мікроскопічному спостереженні реакції відкладання калози за дії грибної інфекції при фарбуванні аніліновим блакитним дало змогу провести візуалізацію 3-D полімерних наносіток [6], що, безперечно, відкрило нові перспективи у гістологічному аналізі стрес-індукованих структурних модифікацій калози у поєднанні з іншими структурними полімерами клітинної стінки.

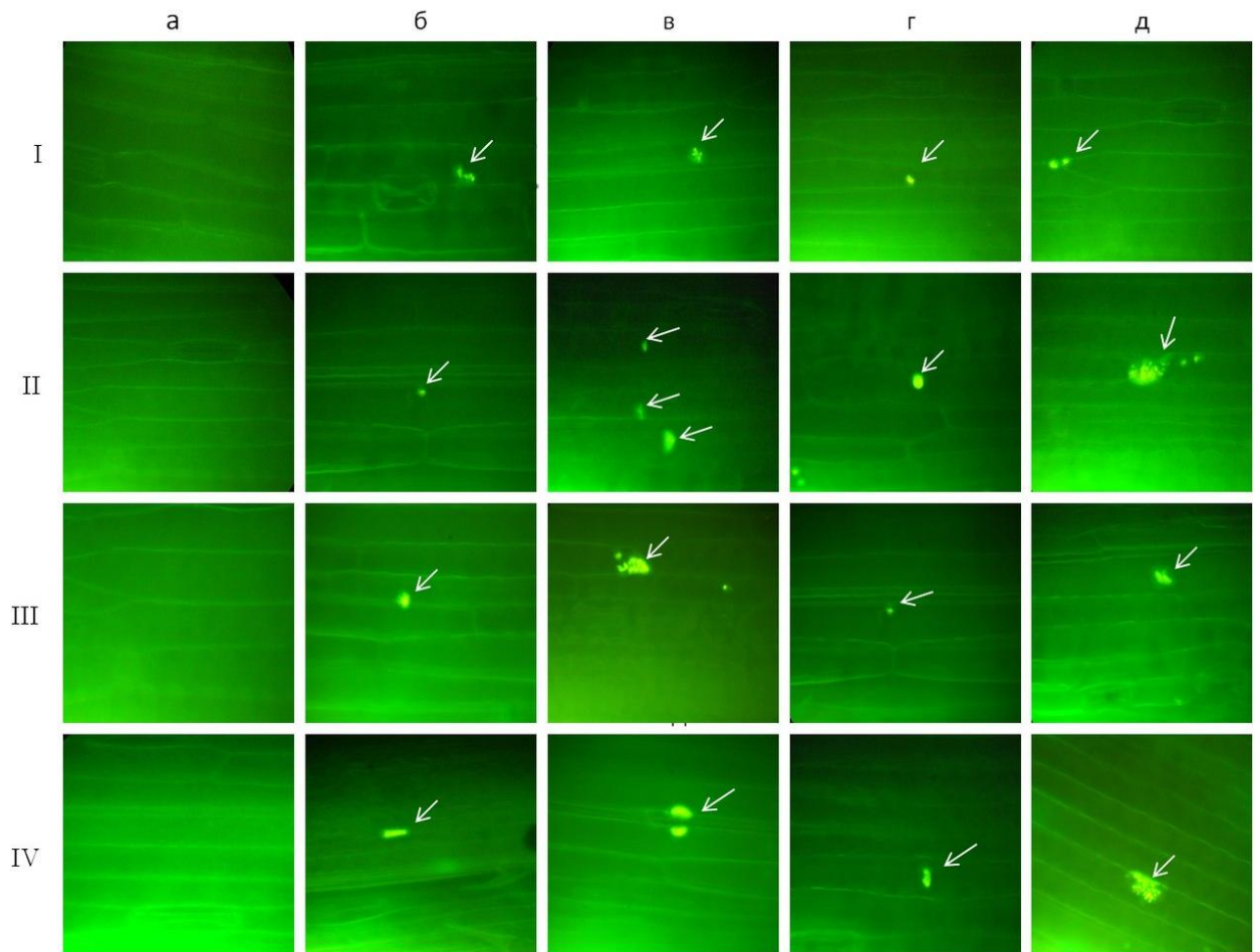
**Метою досліджень** було дослідити здатність клітин проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.) двох сортів контрастних за стійкістю до збудника очкової плямистості, або церкоспорельозу – *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, відкладати калозу у відповідь на інокуляцію патогеном та визначити характер її накопичення і локалізації на ранніх етапах патогенезу.

**Матеріал і методика досліджень.** В експериментах використовували проростки озимої пшениці сорту української селекції Миронівська 808 та сорту французької селекції Renan, що мають різну стійкість до *P. herpotrichoides*. 7-добові проростки обох сортів інфікували суспензією конідій у концентраціях  $1,5 \times 10^2$ -  $1,5 \times 10^5$  колонієутворюючих одиниць у мілілітрі (КУО/мл) високо вірулентного штаму 543 7/1 обраного патогену із колекції Інституту захисту рослин НААН України [3]. Контрольні варіанти обробляли дистильованою

водою. Відбір рослинного матеріалу проводили через 24 та 48 годин після інокуляції.

Дослідження експериментальних зразків реакції відкладання калози проводили методом флуоресцентної мікроскопії при фарбуванні аніліновим блакитним [9]. Середню частину листків проростків пшениці для видалення з них автофлюорисцентного матеріалу витримували ніч в 96% етанолі. Після цього, рослинний матеріал тричі відмивали в 0,07 М фосфатному буфері рН 9,0, поміщали в фосфатний буфер з додаванням 0,01 % розчину анілінового блакитного та витримували протягом 12 годин. Для виготовлення препаратів використовували фосфатний буфер з 0,01% аніліновим блакитним. Мікроскопічні дослідження відкладання калози проводили на люмінісцентному мікроскопі «ЛЮМО» (Санкт-Петербург, Росія), використовуючи фільтри 340-380 nm ( $\lambda_{ex}$ ) і 425 nm ( $\lambda_{em}$ ).

**Результати дослідження.** В результаті проведеного експерименту встановили, що на 24 годину інокуляції патогеном у всіх експериментальних зразках досліджуваних сортів пшениці відбувається накопичення калози в клітинах епідерми листків. В оброблених водою контрольних варіантах проростків пшениці обох сортів, як на 24, так і на 48 годину, накопичення калози не спостерігали (рис., I-IV, – а)



**Рис. Патоген-індуковане відкладання калози в клітинах епідерми листків проростків пшениці за інокуляції суспензією конідій *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton різної концентрації: I –  $1,5 \times 10^2$  КУО/мл; II –  $1,5 \times 10^3$  КУО/мл; III –  $1,5 \times 10^4$  КУО/мл; IV –  $1,5 \times 10^5$  КУО/мл. а – контроль; б – Renan (24 год); в – Renan (48 год); г – Миронівська 808 (24 год); д – Миронівська 808 (48 год). Збільшення 40x17.**

За обробки проростків пшениці сорту Renan суспензією конідій у концентрації  $1,5 \times 10^2$  КУО/мл спостерігали появу чисельних вкраплень калози невеликого розміру (рис., I – б), які мали достатньо слабку люмінесценцію.

У пробах сорту Миронівська 808 при їх обробці такою ж самою концентрацією інокулюма спостерігали конгломерати вкраплень досліджуваного глюкану глобулярної форми і більшого розміру, які, тим не менше мали сумарну люмінесценцію подібну за інтенсивністю до

зразків сорту Renan (рис., I – г, – б). При підвищенні концентрації суспензії конідій до  $1,5 \times 10^3$  КУО/мл накопичення калози у листках проростків сорту Миронівська 808 суттєво зростало (рис., II – г) як у порівнянні зі зразками, обробленими попередньою концентрацією інокуляту (рис., I – г), так і зі зразками сорту Renan, обробленими такою ж самою концентрацією інфекційного матеріалу (рис., II – б). При цьому вкраплення калози у тканинах листків сорту Миронівська 808 мали більші розміри і глобулярну форму зі значно вищою інтенсивністю люмінесценції. Конгломерати калози у пробах сорту Renan при обробці їх даною концентрацією конідій патогену набули глобулярної форми і більшого розміру, але за сумарною люмінесценцією були подібними до зразків сорту Миронівська 808, оброблених попередньою концентрацією інфекційного матеріалу (рис., II – б, I – б). При концентрації інокулюма  $1,5 \times 10^4$  КУО/мл експериментальні зразки сорту Миронівська 808 характеризувалися наявністю локальних, глобулярних конгломератів калози великого розміру, які мали найвищу інтенсивність люмінесценції у порівнянні з усіма експериментальними пробами на 24 годину взаємодії проростків пшениці обох сортів з патогеном (рис., III – г).

Листки проростків пшениці сорту Миронівська 808 при інокуляції патогеном у концентрації  $1,5 \times 10^4$  КУО/мл були здатні накопичувати поодинокі глобулярні вкраплення калози великого розміру (рис., III – б) подібні за інтенсивністю люмінесценції до зразків сорту Renan, оброблених попередньою концентрацією конідій використаного у дослідженні патогенного гриба (рис., II – г). За обробки максимальною концентрацією інокулюма патогену –  $1,5 \times 10^5$  КУО/мл, у пробах обох сортів пшениці спостерігали зменшення інтенсивності люмінесценції вкраплень калози (рис., IV – б, – г) у порівнянні зі зразками обробленими всіма попередніми концентраціями конідій (рис., III – б, – г). Вкраплення досліджуваного глюкану при цьому мали значно менший розмір у порівнянні зі зразками обробленими попередньою концентрацією інокулюма.

У отриманих з листових пластинок сорту Renan зразках, що були оброблені патогеном у концентрації  $1,5 \times 10^5$  КУО/мл, виявили найменші

конгломерати калози та інтенсивність люмінесценції у порівнянні з усіма попередніми експериментальними пробами сорту. Останнє може бути пов'язане з малою ефективністю механічного захисного бар'єру у рослин даного сорту при високих концентраціях інфекційного матеріалу, що за рахунок сильнішого елісаторного імпульсу швидше призводить до деполаризації плазматичної мембрани, зміни іонних потоків у контактуючих з патогеном клітин, кальцій-залежної трансдукції сигналу реалізації більш ефективного – біохімічного захисту системи рослинного організму.

Через 48 годин після інокуляції кількість калози в усіх експериментальних зразках досліджуваних сортів пшениці явно зростала. Про це свідчить збільшення кількості та розміру конгломератів глюкану, інтенсивності його люмінесценції у порівнянні зі станом на 24 годину.

В діапазоні однакових концентрацій при обробці конідіями гриба проростки сорту Renan (рис., – г, – д) показали більш швидку та інтенсивну реалізацію реакції відкладання калози у просторі і часі у порівнянні з проростками сорту Миронівська 808 (рис., – б, – в) та перевищували її за даними характеристиками майже вдвічі. Вкраплення глюкану збільшувались у діаметрі, їх кількість зростала, а люмінесценція ставала інтенсивнішою аж до концентрації інокулюма –  $1,5 \times 10^4$  КУО/мл включно. При подальшому збільшенні концентрації конідій патогену в експериментальних зразках проростків пшениці обох сортів кількість вкраплень та інтенсивність їх люмінесценції зменшувались, як і у випадку досліджень на 24 годину експерименту.

Отже, в результаті проведених мікроскопічних досліджень було встановлено, що обробка проростків озимої пшениці суспензією конідій гемібіотрофного гриба *P. herpotrichoides* призводить до відкладання калози в місцях інвазії патогену. У сорту Renan у порівнянні з сортом Миронівська 808 спостерігали швидке та інтенсивніше формування механічного захисного бар'єру, за рахунок чого більш ефективно пригальмовується та затримується проростання гіфів гриба, що запобігає їх проникненню у клітини та швидкому

поширенню патогену в інші частини організму. Більш швидке та інтенсивне відкладання калози проростками сорту Renan є важливим у загальній стійкості даного сорту та безперечно сприяє зменшенню впливу патогенного стресу на клітини і тканини до розгортання більш ефективного генетично детермінованого біохімічного ешелонованого захисту. Останній, на відміну від досліджуваної захисної реакції, потребує значно більшого часу для своєї реалізації [1].

Можливо, що дійсно здатність до більш інтенсивного відкладання калози клітинами проростків сорту Renan порівняно із проростками пшениці сорту Миронівська 808 при їх обробці однаковими концентраціями інокулюма саме і забезпечує більш високу хворобостійкість даного сорту до збудника очкової плямистості. Але остаточну відповідь на це питання зможуть дати результати кількісного аналізу накопичення калози у проростках обраних для дослідження сортів і аналіз наявності біохімічних захисних речовин, наприклад, фенольних і флавоноїдних сполук. Отримання числових даних щодо накопичення речовин захисних метаболітів у проростків пшениці обраних сортів дозволить зрозуміти роль механічного та біохімічного захисних бар'єрів, послідовність та зміни співвідношення елементів захисту, які підтримують у рослині стрес-толерантність до церкоспорельозу.

### **Висновки**

1. Отримані результати узгоджуються із даними щодо різної стійкості використаних сортів пшениці до збудника очкової плямистості, згідно з якими сорт Миронівська 808 має нижчий поріг стійкості до *P. herpotrichoides* порівняно із сортом Renan.

2. Інтенсивність накопичення калози в стінках клітин проростків пшениці досліджуваних сортів залежить від концентрації інокулюма патогену та поступово зростає протягом 48 годин.

3. При збільшенні кількості інокулюма, у проростків сорту Renan виявили пряму залежність зростання інтенсивності люмінесценції калози від використаних концентрацій конідій гриба –  $1,5 \times 10^2$  -  $1,5 \times 10^4$  КУО/мл.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дмитриев А.П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений / А.П. Дмитриев – К.: Наук. думка, 1999. – 209 с.
2. Емельянов В.И. Отложение каллозы при обработке клеток томатов (*Lycopersicon esculentum* L.) биотическими элиситорами / В.И. Емельянов, Ж.Н. Кравчук, С.А. Поляковский, А.П. Дмитриев // Цитология и генетика. – 2008. – № 2. – С. 21-28.
3. Патент на корисну модель 389960, Україна, А01Н 1/04. Спосіб інфікування для оцінки рівня стійкості озимої пшениці до збудника церкоспорельозу / Панюта О.О., Белава В.Н., Таран Н.Ю. – Бюл. №9. Заяв. 01.11.2013. Опубл. 12.05.2014.
4. Botha CEJ. Reduction in transport in wheat (*Triticum aestivum*) is caused by sustained phloem feeding by the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) South / CEJ Botha, B. Matsiliza // African Journal of Botany. – 2004. – № 7. – P. 249–254.
5. Currier HB. Callose substance in plant cells / HB. Currier // American Journal of Botany. – 1957. – № 4. – P. 478–488.
6. Eggert D. Nanoscale glucanpolymer network causes pathogen resistance / D. Eggert, M. Naumann, R. Reimer, CA. Voigt // Scientific Reports. – 2014. – № 4. – P. 4159.
7. Ellinger D. Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis / D. Ellinger, M. Naumann, C. Falter // Plant Physiology. – 2013. – № 6. – P. 1433–1444.
8. Eschrich W. Sealing systems in phloem / W. Eschrich, J.A. Zimmerman, M.N. Milburn // Enciclopedia of plant physiology. Springer-Verlag. – 1975. – № 1. – P. 68-132.
9. Kauss H. The degrees of polimerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus* / H. Kauss, W. Jeblick, A. Domard //

- Planta. – 1989. – № 8. – P. 385 – 393.
10. Li J. Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR / J. Li, C. Zhao-Hui, M. Batoux // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2009. – № 6. – P. 15973 – 15978.
  11. Luna E. Callose deposition: a multifaceted plant defense response / E. Luna, V. Pastor, J. Robert // Mol. Plant Microbe Interact. – 2011. – № 2, – P. 183–193.
  12. Nakashima J. New insight into the mechanism of cellulose and callose biosynthesis: proteases may regulate callose biosynthesis upon wounding / J. Nakashima, W. Laosinchai, X. Cui, R.M. Brown // Cellulose. – 2003. – № 4, – P. 369–389.
  13. Poliakovskiy S.O. Study of priming for callose accumulation in *Allium cepa* during treatment with biotic inducers / S.O. Poliakovskiy, O.P. Dmitriev // Cytol. Genet. – 2011. – № 4, – P. 245–248.
  14. Xie B. Expression of callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration / B. Xie, Y. Deng, M.M. Kanaoka, K. Okada, Z. Hong // Plant Science – 2012. – № 13. – P. 1–8.
  15. Xie B. Precocious pollen germination in Arabidopsis plants with altered callose deposition during microsporogenesis / B. Xie, X. Wang, Z. Hong // Planta. – 2010. – № 23. – P. 809–823.
  16. Zhou J. Callose Measurer: a novel software solution to measure callose deposition and recognise spreading callose patterns / T. Spallek, C. Faulkner, S. Robatzek // Plant Methods. – 2012. – № 8. – P. 49.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ  
ИССЛЕДОВАНИЙ КАЛЛОЗЫ В ИЗУЧЕНИИ РЕАКЦИЙ  
СТРЕТОЛЕРАНТНОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ  
ПАТОГЕНЕЗЕ**

**Е. П. Бобошко, О. А. Панюта, В. И. Емельянов, Н. Ю. Таран**

*Аннотация. Рассмотрены защитные функции каллозы, как механического барьера, что образуется растительными клетками в ответ на*

*патогенез. Установлено концентрационную зависимость наличия патогенов и характер отложения каллозы в растениях пшеницы разных по устойчивости сортов. Методом флуоресцентной микроскопии исследована локализация каллозы в клеточных стенках эпидермиса листьев проростков пшеницы при инокуляции возбудителем церкоспореллеза (глазковой пятнистости). Установлено различия в интенсивности и характере отложения каллозы в клетках проростков пшеницы двух разных по устойчивости сортов за использование различных концентраций суспензии.*

**Ключевые слова:** *каллоза, пшеница, микроскопические методы, суспензия конидий, Pseudocercospora herpotrichoides, патогенез*

## **MICROSCOPIC METHODS IN CALLOSE STUDY AND THEIR APPLICATION IN WHEAT SEEDLINGS PROTECTIVE REACTIONS RESEARCH UNDER PATHOGENESIS**

**O. Boboshko, O. Panyuta, V. Emelyanov, N. Taran**

**Abstract.** *Callose protective function as a mechanical barrier formed by plant cells in response to pathogenesis is described. Concentrational dependence on the presence of pathogens and the character of callose deposition of different resistance wheat varieties is determined. Callose localization in epidermis cell walls of wheat seedlings' leaves after pathogen inoculation (eyespot exciter) is investigated by fluorescence microscopy. Differences in the intensity and the nature of callose deposition in wheat seedlings' cells of two varieties with different resistance using different inoculum concentrations are determined.*

**Key words:** *callose, wheat, microscopic methods, conidia suspension, Pseudocercospora herpotrichoides, pathogenesis*