

УДК 632.9: 662.73

С.Н. Удинцев<sup>1</sup>, Т.И. Бурмистрова<sup>1</sup>, А.В. Заболотская<sup>2</sup>, Т.П. Жилиякова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства  
и торфа Россельхозакадемии (г. Томск)

<sup>2</sup>Томский государственный университет (г. Томск)

## МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАСТЕНИЙ К ФИТОПАТОГЕНАМ ГУМИНОВЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

*В обзоре представлены основные результаты экспериментальных исследований и практического применения гуминовых веществ (ГВ) в качестве индукторов резистентности растений к фитопатогенам. В качестве ведущего механизма действия ГВ обсуждается сигнальный путь, в котором принимают участие ауксин-индоллил-3-уксусная кислота и фермент пероксидаза. Данные, представленные в настоящем обзоре, позволяют сформулировать научно обоснованный подход к разработке высокоэффективных препаратов – индукторов устойчивости растений на основе ГВ, источником которых является, в частности, торф, ресурсы которого в Томской области одни из самых крупных в мире.*

**Ключевые слова:** индуцированная резистентность растений; фитопатогены; гуминовые вещества; пероксидаза; индоллил-3-уксусная кислота; активные формы кислорода.

### Введение

Поиск эффективных препаратов для борьбы с фитопатогенами приобретает все большую актуальность. Так, только в период с 1993 по 2008 г. за счет болезней зерновых, в первую очередь гнилей, потери зерна в России превысили 230,6 млн т, что составляет в среднем от 6 до 29% ежегодного валового сбора [1]. Для решения этой проблемы в сельскохозяйственной практике все более широко применяются препараты третьего поколения фунгицидов – индукторов устойчивости к патогенам. Подобные препараты, обладая широким спектром защитных эффектов, не проявляют непосредственного токсического воздействия по отношению к патогену, растениям и животным и не оказывают негативного воздействия на рост растений [2–3].

### Роль пероксидаз в формировании индуцированной резистентности растений

Согласно современным представлениям, индуцированная резистентность развивается при воздействии на растения элиситоров (индукторов устойчивости) [3, 4]. Элиситоры активируют комплексную сеть сигнальных путей, включающую такие регуляторные молекулы, как салициловая и жасмоновая кислоты (SA и JA) и их производные, индоллил-3-уксусная кислота

(IAA) и другие соединения, в результате чего индуцируется синтез *de novo* белков, связанных с патогенезом (pathogenesis-related proteins, PR), которые подразделяются, в зависимости от их биохимических и молекулярных особенностей, на 17 субсемейств. Функции PR-белков существенно шире, чем участие в защитных механизмах: они всегда в определенных количествах присутствуют в клетках, играя важную роль в различных процессах регуляции роста и развития растений [5–7].

PR-белки реализуют различные механизмы защиты клеток, наиболее ранним из которых является повышение образования активных форм кислорода (АФК). Среди всех АФК наибольшую роль играет перекись водорода  $H_2O_2$ , регулирующая в растительной клетке совокупность молекулярных, биохимических и физиологических реакций. В частности, это соединение способно инициировать октадеканойдный метаболический путь, ведущий к биосинтезу JA и ее производных. Незначительное увеличение уровня  $H_2O_2$  повышает толерантность клеток к стрессу, а гиперпродукция («окислительный взрыв») не только создает высокотоксичное микроокружение, но и провоцирует локальный ответ, завершающийся апоптозом – формой программируемой смерти клеток в месте инфекции, что в комплексе является элементами ограничения клеточного распространения патогена либо повышением резистентности клетки к абиотическим стрессам. Таким образом,  $H_2O_2$  опосредует взаимодействие между сигнальными путями и сама является сигнальной молекулой, ответственной за перекрестную резистентность клеток к различным экстремальным воздействиям [8].

Существуют четыре механизма, объясняющие образование  $H_2O_2$  в растительной клетке. Один из них функционирует на уровне внешней поверхности плазменной мембраны и опосредован PR-белком – ферментом NADPH-зависимой оксидазой. Три механизма реализуются на уровне матрикса клеточной стенки и включают участие пероксидазы, поли(ди)аминоксидазы и оксалат оксидазы. В отличие от последних двух ферментов, которые участвуют в процессах образования непосредственно перекиси водорода, NADPH-зависимая оксидаза и пероксидаза катализируют начальное образование аниона супероксида, который далее дисмутирует в  $H_2O_2$  [9, 10]. Из всех перечисленных ферментов, участвующих в индукции системной резистентности, наибольший интерес вызывает пероксидаза.

Пероксидаза, а точнее, обширное мультигенное семейство ферментов – классических пероксидаз растений класса III, содержащих в качестве протетической группы гем b (фотогемин IX) и два иона  $Ca^{2+}$ , относят к 9-му классу PR-белков. Растительные пероксидазы не только аккумулируются локально в месте инфекции или при воздействии абиотических факторов, но и экспрессируются системно и, как и другие PR-белки, всегда присутствуют в растениях в определенном количестве. Они участвуют в регуляции широкого спектра физиологических процессов в течение всего цикла жизни растений благодаря большому количеству изоформ и множественности

реакций, катализируемых ими. Основная функция пероксидаз – катализировать окисление перекисью водорода  $H_2O_2$  различных электрон-донорных субстратов, в первую очередь полифенольной структуры. В то же время при избытке субстратов, обладающих высоким восстанавливающим потенциалом, пероксидазы начинают проявлять оксигеназную активность, катализируя генерацию  $H_2O_2$  [11]. В частности, этот феномен имеет место при избытке ауксина-индолил-3-уксусной кислоты (ИАА) и обусловлен наличием в молекуле фермента дополнительного специфического центра связывания с этим соединением. Подобный механизм формирования индуцированной резистентности, получивший название ИАА-пероксидазный сигнальный путь, описан сравнительно недавно [12]. В процессе индукции резистентности участие пероксидаз определяется не только генерацией высокотоксичных молекул  $H_2O_2$ , но и установлением структурных барьеров в результате стимуляции процессов лигнификации и суберизации клеточной оболочки, формирования перекрестных сшивок полисахаридов стенки клетки, опосредованных окислением их компонента – феруловой кислоты [9].

Показано, что уровень пероксидаз в клетках сортов растений, устойчивых к патогенам, выше, чем восприимчивых. Такие данные получены, в частности, для картофеля [13] и гороха [14].

Учитывая широкий диапазон эффектов пероксидаз, поиск эффективных индукторов резистентности растений активно ведется среди соединений, способствующих повышению в растительных клетках уровня этих ферментов. Перспективными для решения задачи рассматриваются средства природного происхождения [15]. Особый интерес в качестве источника получения новых эффективных индукторов резистентности, функционирующих посредством ИАА-пероксидазного сигнального пути, вызывают гуминовые вещества (ГВ), в течение многих лет успешно применяющиеся в растениеводстве. ГВ обладают способностью регулировать метаболизм растительной клетки, влияя на проницаемость мембран, транспорт ионов, процессы фотосинтеза, синтез АТФ, аминокислот, белков, углеводов и нуклеиновых кислот, регулируя активность многих ферментов [16]. ГВ являются регуляторами роста растений, проявляя ауксиноподобные свойства [17].

### Фунгистатические эффекты препаратов на основе ГВ

В литературе имеются многочисленные данные, свидетельствующие о фунгистатическом эффекте препаратов на основе ГВ. В экспериментах *in vitro* препараты ГВ подавляли возбудителей корневой, стеблевой, плодовой гнилей различных сельскохозяйственных культур: снижали рост мицелия *Fusarium culmorum* и *Alternaria alternata* [18], радиальный рост и герминацию спор *F. oxysporum f.sp. melonis* и *F. oxysporum f.sp. lycopersici* [19], подавляли рост *F. solani* [20], снижали выраженность ранних проявлений

гнили *A. solani* [21], подавляли рост мицелия *Choanephora cucurbitaru* [22]. Ингибирование роста *F. oxysporum* выявлена при применении препаратов на основе ГВ, полученных из сфагнового торфа Томской области [23].

В полевых исследованиях препараты на основе ГВ при различных схемах их применения повышали естественную резистентность герани к возбудителям серой гнили *Botrytis cinerea* [24], огурца – к корневым гнилям *Pythium ps.* и антракнозу тыквенных культур *Colletotrichum lagenarium* [25], арахиса – к корневым гнилям *F. oxysporum* Schlecht и возбудителю антракноза *Aspergillus niger* Vantighn [26], гороха – к корневым гнилям *Pythium ultimum* [27], картофеля – к *A. solani* [21], бобовых – к грибам *Rhizoctonia solani*, *F. solani* [28] и возбудителям шоколадной пятнистости листьев, вызываемой *Botrytis fabae* Sardine [29], корней мандарина – к гнилям *Fusarium sp.* [20], томатов – к *Cladosporium fulvum* и *A. solani* [2]. Отмечена более выраженная степень снижения пораженности возбудителями корневой гнили пшеницы *Helminthosporium sativum*, *F. oxysporum*, *A. alternata* в условиях Западной Сибири при предпосевной обработке семян и вегетирующих растений препаратом на основе комплекса ГВ торфа [23].

### Механизмы действия ГВ как индукторов резистентности

Данные многих исследований позволяют предполагать, что фунгистатический эффект ГВ связан с индукцией ими резистентности растений с участием упомянутого выше IAA-пероксидазного механизма [12]. При обработке гуматом натрия семян томатов активность пероксидазы у сорта, устойчивого к *C. fulvum* и *A. solani*, возросла в 1,8 раза [2]. Возрастание устойчивости к неблагоприятным факторам при воздействии препаратов ГВ, сопровождающееся повышением уровня пероксидаз, отмечено у семян гороха [30]. IAA в составе ГВ впервые были идентифицированы Muscolo A. et al. в 1998 г., и в настоящее время ауксиноподобный эффект ГВ связывают именно с данным соединением [31]. Показано, что IAA находится преимущественно во фракциях ГВ с относительно низкой молекулярной массой (<3 500 Да), достигая уровня 37 нмоль мг<sup>-1</sup> углерода [32]. Содержание IAA в среднекислых торфах Томской области составляет 69,3–120,7 мкг/кг<sup>-1</sup> сухой массы, в торфах высокой степени заболоченности достигает 210, низкой степени – 134 мкг/кг<sup>-1</sup> сухой массы; наиболее высокий уровень IAA характерен для вторично трансформированных торфяно-болотистых почв [10, 33]. Более значительно содержание IAA в кислых почвах по сравнению с щелочными, ГВ которых проявляют преимущественно гиббереллиноподобный эффект [34]. У ГВ, выделенных из кислых почв, выше показатели отношения углерода к азоту и отношения углерода гуминовых веществ к общему углероду [35].

В культуре растительных клеток ГВ, полученные из кислых почв с наибольшей ауксиноподобной активностью, индуцировали наиболее высокий уровень активности и полиморфизма пероксидазы [35]. В экспериментах

*in vitro* с использованием каллусных культур показано, что способность стимулировать рост клеток и повышать уровень пероксидазы, сравнимая с эффектами IAA, зависит как от молекулярной массы ГВ, так и от их структуры. IAA-подобный эффект отмечен преимущественно у фракций ГВ с относительно низкой молекулярной массой (<3 500 Да), характеризующихся наличием карбоксильных, пептидных и углеводных групп, остатков органических кислот, бетаина. Фракции с молекулярной массой более 3 500 Да, содержащие сахароподобные, полиэфирные, фенольные и жирнокислотные остатки, данного вида активности не проявляли [36–38]. Именно низкомолекулярные фракции ГВ, содержащие преимущественно гидроксильные, хиноидные и карбоксильные группы, обладали наибольшей антифунгальной активностью [32, 22].

Индукция образования АФК в растениях при воздействии ГВ связана с наличием у последних прооксидантных свойств. Ди- и тригидроксифенольные и хинонные структуры ГВ вызывают повышение в клетках уровня стабильных радикалов бензосемихинонов, способных повреждать клеточные структуры патогенов непосредственно либо в результате образования радикала супероксида, который при дефиците фермента супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода  $H_2O_2$  [7]. Перекись водорода определяет цитотоксическое действие ГВ, в частности по отношению к возбудителям *Fusarium* sp. Trans [39].

### Заключение

Таким образом, на основании данного обзора литературы можно сделать вывод о перспективах применения препаратов на основе ГВ, в том числе торфа, ресурсы которого в Томской области являются одними из самых крупных в мире, в качестве препаратов для индукции резистентности растений к фитопатогенам. Эффективность таких препаратов может определяться в значительной степени воздействием ГВ на такой механизм формирования резистентности, как образование активных форм кислорода в ходе IAA-пероксидазного сигнального пути, и в значительной степени будет зависеть от молекулярной массы, структуры и состава ГВ.

### Литература

1. Санин С.С., Назарова Л.Н. Фитосанитарная обстановка на посевах пшеницы в Российской Федерации (1991–2008 гг.). Аналитический обзор // Защита и карантин растений. 2010. № 2. С. 69–88.
2. Поликсенова В.Д. Индуцированная резистентность растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) // Вестник БГУ. 2009. сер. 2. № 1. С. 48–60.
3. Тютчев С.Л. Механизмы действия фунгицидов на фитопатогенные грибы. СПб. : ИПК «Нива», 2010. 172 с.

4. Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites // *Biotechnol. Adv.* 2005. Vol. 23. P. 283–333.
5. Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E. Early signaling events induced by elicitors of plant defences // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 2006. Vol. 7. P. 711–724.
6. Scherer N.M., Thompson C.E., Freitas L.B. Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins // *Genetics & Molec. Biol.* 2005. Vol. 28. P. 645–653.
7. Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants // *Ann. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 135–162.
8. Neill S.J., Desikan R., Clarke A. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants // *J. Experim. Botany.* 2002. Vol. 53. P. 1237–1247.
9. Almagro L., Ros L.V.G., Belchi-Navarro S. Class III peroxidases in plant defence reactions // *J. Experim. Botany.* 2009. Vol. 60(2). P. 377–390.
10. Szajdak L., Maryganova M. Occurrence of auxin in some organic soils // *Agron. Res.* 2007. № 5(2). P. 175–187.
11. Passardi F., Zamocky M., Favet J. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are these patches of order in chaos? // *Gene.* 2007. Vol. 397. P. 101–113.
12. Газарян И.Г., Хуштульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // *Успехи биологической химии.* 2006. Т. 46. С. 303–322.
13. Граскова И.А., Антитина И.В., Потапенко О.Ю., Войников В.К. Влияние патогена на динамику активности внеклеточной пероксидазы суспензионных клеток картофеля // *J. Stress. Physiology & Biochemistry.* 2005. Vol. 1(1). P. 16–20.
14. Козьявина К.Н. Изменение активности антиоксидантной ферментной системы и фрагментации ДНК *Pisum sativum* L. при апоптозе и некрозе под действием двухвалентных ионов магния и экстракта триходермы : автореф. ... канд. биол. наук. Воронеж, 2010. 24 с.
15. Wedge D.E., Smith B.J. Discovery and evaluation of natural product-based fungicides for disease control of small fruits // *Disease management of fruits and vegetables.* Springer Netherlands, 2006. Vol. 2. P. 1–14.
16. Pflug W., Ziechman W. Humic acids and disruption of bacterial cell wall by isozyme // *Soil Boil Biochem.* 1982. Vol. 14. P. 165–166.
17. Шаповал О.А., Вакуленко В.В., Прусакова Л.Д. Регуляторы роста растений // *Защита и карантин растений.* 2008. № 12. С. 53–88.
18. Moliszewska E., Pisarek T. Influence of humic substances on the growth of two phytopathogenic soil fungi // *Environ. Int.* 1996. Vol. 22. P. 579–584.
19. Loffredo E., Mariagrazia B., Fedele C., Nicola S. In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum* // *Cooper. J. Intern. Soc. Soil. Sci.* 2007. Vol. 1. P. 1–18.
20. El-Mohamedy R. S.R., Ahmed M.A. Effect of Biofertilizers and Humic Acid on control of Dry Root Rot Disease and Improvement Yield Quality of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) // *Research J. Agric. & Biol. Sci.* 2009. Vol. 5(2). P. 127–137.
21. Abd-El-Kareem F., Abd-El-Latif F. M., Fotouh Y.O. Integrated Treatments Between Humic Acid and Sulfur for Controlling Early Blight Disease of Potato Plants under Field Infection // *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 2009. Vol. 5(6). P. 1039–1045.
22. Siddiqui Y., Meon S., Ismail R. In vitro fungicidal activity of humic acid fraction from oil palm compost // *Int. J. Agric. Biol.* 2009. Vol. 11. P. 448–452.
23. Сысоева Л.Н., Бурмистрова Т.И., Трунова Н.М. Применение продуктов переработки торфа в качестве индукторов защиты растений от грибных инфекций // *Химия растительного сырья.* 2008. № 1. С. 123–126.
24. Scheuerell S.J., Mahaffee W.H. Variability associated with suppression of Gray Mold (*Botrytis cinerea*) on Geranium by foliar applications of nonaerated and aerated compost teas // *Plant. Dis.* 2006. Vol. 90. P. 1201–1208.

25. *Hoitink H.A.J., Ramos L.Z.* Disease suppression with compost: history, principles and future // Intern. Conf. «Soil & Compost Eco Biology». Leon – Spain, 2004. P. 185–198.
26. *Ziedan H.E.* Soil treatment with biofertilizers for controlling peanut rot and pod Rot diseases in Nobarria Province // Egypt J. Phytopathol. 2000. Vol. 28. P. 17–26.
27. *Pascual J.A., Garcia G., Hernandez T., Lynch I.* Effectiveness of municipal waste compost and its humic fraction in suppressing *Pythium ultimum* // Microb. Ecol. 2002. Vol. 44. P. 59–68.
28. *Abd-El-Kareem F.* Induced Resistance in Bean Plants Against Root Rot and Alternaria Leaf Spot Diseases Using Biotic and Abiotic Inducers under Field Conditions // Res. J. Agric. & Biol. Sci. 2007. Vol. 3(6). P. 767–774.
29. *El-Ghamry A.M., El-Hai K.M.A., Ghoneem K.M.* Amino and Humic Acids Promote Growth, Yield and Disease Resistance of Faba Bean Cultivated in Clayey Soil // Australian J. Basic. & App. Sci. 2009. Vol. 3(2). P. 731–739.
30. *Юшкова Е.И.* Биологическая активность гуминового комплекса различного происхождения и его влияние на рост и развитие растений : дис. ... д-ра биол. наук. Воронеж, 2010. 356 с.
31. *Muscolo A., Cutrupi S., Nardi S.* IAA detection in humic substances // Soil Biology and Biochemistry. 1998. Vol. 30(8–9). P. 1199–1201.
32. *Quaggiotti S., Ruperti B., Pizzeghello D.* Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.) // J. Experim. Botany. 2004. Vol. 398. P. 803–813.
33. *Szajdak L., Maryganova V.* Quantities of indole-3-acetic acid in secondary transformed peat-moorsh soils // Вестник ТГПУ. 2008. Вып. 4 (78). С. 34–38.
34. *Pizzeghello D., Nicolini G., Nardi S.* Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* forests // New Phytologist. 2001. Vol. 151 (3). P. 647–657.
35. *Pizzeghello D., Nicolini G., Nardi S.* Hormone-like activities of humic substances in different forest ecosystems // New Phytologist. 2002. Vol. 155 (3). P. 393–402.
36. *Muscolo A., Sidari M., Attinà E.* Biological Activity of Humic Substances Is Related to Their Chemical Structure // Soil Sci. Soc. Am. J. 2007. Vol. 71. P. 75–85.
37. *Muscolo A., Sidari M., Francioso O.* The Auxin-like Activity of Humic Substances is Related to Membrane Interactions in Carrot Cell Cultures // J. Chem. Ecol. 2007. Vol. 33. P. 115–129.
38. *Muscolo A., Sidari M.* Carboxyl and Phenolic Humic Fractions Affect *Pinus nigra* Callus Growth and Metabolism // Soil. Sci. Soc. Am. J. 2009. Vol. 73. P. 1119–1129.
39. *Saito M., Ichinoi M., Tsuruta O.* Usefulness of gel electrophoresis comparison of peroxidase for identification of *Fusarium spp.* Trans // Mycol. Soc. Japan. 1980. Vol. 21. P. 229–235.

Поступила в редакцию 11.04.2011 г.

Sergey N. Udintsev<sup>1</sup>, Tatiana I. Burmistrova<sup>1</sup>, Anastasiya V. Zabolotskaya<sup>2</sup>,  
Tatiana P. Zhilyakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The State Scientific Institution “Siberian Research Institute of Agriculture and Peat  
of Russian Academy of Agricultural Sciences”, Tomsk, Russia

<sup>2</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russia

## THE MECHANISMS OF INDUCTION OF PLANTS RESISTANCE TO PHYTOPATOGENS WITH HUMIC SUBSTANCES

The data of modern domestic and foreign scientific literature devoted to one of the most topical problems of agricultural science – the development of effective preparations of the new generation to struggle with phytopathogens – the inducers of plants resistance, is presented in a review. The effect of elicitors – the inductors of resistance which activates the net of signal ways, including auxin-indolil-3-acetic acid (IAA) and inducing the synthesis of pathogenesis-related proteins (PR-protein) is discussed as a basic mechanism of the following phenomenon. One of these mechanisms is examined – the increasing of reactive oxygen species formation,  $H_2O_2$ , in a first place with the participation of one of PR-proteins families – the cells peroxydases enzymes. The level of ones is known to be higher in cells of plants species resistant to pathogens, then in sensitive ones. The activity of plant peroxydases was shown to be increased at the abundance of IAA and this mechanism – AA-peroxydase signal way – is discussed in a review.

As one of the compounds which activate the following signal way, the humic (HS) substances are presented. The latter are known to possess the auxin-like effect connected with the presence of IAA in the structure and the possibility to induce the peroxydases formation in plants cells. The results of experimental and practical investigations of HS application confirming the ability of ones to induce the plants resistance to phytopathogens of *Fusarium*, *Alternaria*, *Choanephora*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* etc species are presented. The preparation on the basis of peat HA was shown to decrease the infection level of wheat root rots in the conditions of West Siberia.

The mechanisms of these effects discussed from the point of view of HS participation in a IAA – peroxydase signal way. The dependence of this effect from IAA content in different fractions of HS, the molecular mass of ones, the presence of definite chemical groups and physico-chemical characteristics of HS source (soil, peat) discussed as well.

The data, presented in a following review, allows to formulate the scientifically based approach to the development of highly effective preparations – inducers of plants resistance on the basis of HS of peat origin, in particular. The resource of this mineral raw material in Tomsk region are known to be one of the greatest in the world.

**Key words:** induced resistance of plants; phytopatogens; humic substances; peroxydase; indolil-3-acetic acid; reactive oxygen substances.

Received April 11, 2011