

The content of phenolic compounds in the seedlings of triticale *in vitro* at infectious stress

Natalia Osokina¹, Elena Kalashnikova^{1,*}

¹ Russian State Agrarian University - MTAА, Russian Federation

Received: 02 December 2015 - Revised: 09 February 2016 - Accepted: 19 February 2016

Abstract: The study analyzes the influence of growth regulators on the development of seedlings triticale sufficed *Fusarium*. The triticale is a valuable crop as the grain and green mass is used for feeding of farm animals. For the study the species of *Fusarium* fungi were used, which are often occurs found on the crops of our region, they are: *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* and *F. avenaceum*. The research was focused on their correlation with different concentrations of growth regulators dissolved in nutrient medium. These drugs are environmentally friendly, which is very important when using triticale for human nutrition and animal feed. The experiments showed that concentrations in some medications could have an inhibitory effect on the development of the fungi and inhibit the development of *Fusarium*. First culture for triticale it is shown that in seedlings, cultivated *in vitro*, increases the total content of soluble phenolic compounds in response to infectious stress when used as the drug "Immunocytophite" and arachidonic acid of plant origin. It is established that the phenolic compounds varies depending on the concentration of the drug and the studied accessions.

Key words: Growth Regulators, Arachidonic Acid, Triticale, *Fusarium*, *In Vitro*,

Содержание фенольных соединений в проростках тритикале *in vitro* при инфекционном стрессе

Abstract: В наши дни для борьбы с грибными болезнями, которые значительно снижают урожайность и качество сельскохозяйственной продукции значимых культур, широко приме няют химические препараты. Альтернативным решением этой проблемы может стать применение регуляторов роста. В работе изучали грибы рода *Fusarium*: *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* и *F. avenaceum*. В качестве регуляторов роста применяли препараты Иммуноцитопфит, арахидоновая кислота на основе морских водорослей. Установлено, что препараты Иммуноцитопфит (в концентрации 7,5 мл/л) и арахидоновая кислота на основе морских водорослей (в концентрации 1мл/л) оказывают ингибирующее действие на развитие поверхностного мицелия всех исследуемых патогенов. В вариантах совместного культивирования патогена и зерновок тритикале действие регуляторов роста усиливается. Впервые для культуры тритикале показано, что в проростках, культивируемых *in vitro*, повышается суммарное содержание растворимых фенольных соединений в ответ на инфекционный стресс при использовании как Иммуноцитопфита, так и арахидоновой кислоты растительного происхождения. Установлено, что образование фенольных соединений изменяется в зависимости от концентрации препарата и изучаемого сортаобразца.

Ключевые слова: регуляторы роста, иммуноцитопфит, арахидоновая кислота, тритикале, фузариоз, *in vitro*.

*Corresponding Authors- Елена Калашникова: kalash0407@mail.ru Наталья Осокина: natali5-13@mail.ru

1. Введение

Основной целью селекционных программ в настоящее время является повышение урожайности сельскохозяйственных культур, создание новых сортов и гибридов, обладающих улучшенными качествами продукта, комплексной устойчивостью к болезням, вредителям и стрессовым факторам окружающей среды [1, 2].

Зерновые культуры вносят наибольший вклад в обеспечение населения земного шара продуктами питания. Среди этих культур особое место отводится амфидиплоиду тритикале, который совмещает ценные качества родительских форм – пшеницы и ржи. Тритикале привлекает к себе внимание в связи с тем, что по ряду таких важнейших показателей, как урожайность, питательная ценность продукта и другие, эта культура способна во многих сельскохозяйственных районах мира превосходить обоих родителей. Однако данная культура часто подвергается различным инфекционным заболеваниям, в частности, семена, а также надземная часть растений поражаются грибами рода *Fusarium* L. [3, 4].

Для повышения устойчивости растений к болезням, как правило, в промышленных посевах широко применяют опасные для окружающей среды фунгициды. Одной из альтернативных и эффективных мер по увеличению невосприимчивости зерновых культур к возбудителям болезни с экологической и практической точек зрения, является использование регуляторов роста. Данное направление исследований, прежде всего, позволит снизить уровень фунгицидной нагрузки на окружающую среду. По литературным данным известно, что регуляторы роста в определённых концентрациях оказывают влияние на устойчивость растений к грибным болезням разного вида, в частности фузариозу. Эти вещества способны ингибировать развитие инфекции и ускорять ответную реакцию растения на действие патогена. Ответом на патоген является повышение в их тканях, например, содержания фенольных соединений, которые относятся к защитному механизму растений. Известно, что фенольные соединения являются вторичными метаболитами растения, а также принимают участие во многих биохимических процессах. Эти соединения относятся также и к стрессовым метаболитам, синтез которых резко возрастает при поранении или поражении растения, что предполагает их участие в комплексной защитной реакции [5, 6].

Исходя из выше изложенного, следует заключить, что исследования в этом направлении являются актуальными, а полученные результаты могут иметь как практическое, так и теоретическое значение. Особую актуальность такие исследования представляют для культуры тритикале, так как в доступной для нас литературе работы по применению регуляторов роста при борьбе с фузариозом отсутствуют.

2. Материалы и методы

Для эксперимента было выбрано три сортообразца тритикале (Укро, Дублет, С95) из коллекции кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства Российского государственного аграрного университета-МСХА имени К.А. Тимирязева. Сортообразцы отличались между собой по восприимчивости к грибным болезням и устойчивостью к фузариозу.

В эксперименте были выбраны два регулятора роста, отличающиеся по своему спектру действия: Иммуноцитифит (этиловый эфир арахидоновой кислоты), Арахидоновая кислота (на основе морских водорослей).

Иммуноцитифит – регулятор роста, обладающий ростовой и антистрессовой активностью. Действующее вещество - этиловый эфир арахидоновой кислоты (этиларакхидонат).

Арахидоновая кислота растительного происхождения (АК) – омега-6 полиненасыщенная незаменимая жирная кислота, которая является составной частью витамина F. Это вещество природного происхождения, активно участвует в регуляции функционирования клеточных мембран и играет важную роль в метаболических процессах. АК растительного происхождения массово получают из морской одноклеточной водоросли *Porphyridium*.

Исследуемые препараты изучали в следующих концентрациях: Иммуноцитифит - 7,5 мл/л, арахидоновая кислота на основе морских водорослей – 1 мл/л. Регуляторы роста добавляли в состав питательной среды, на которой в дальнейшем осуществляли совместное культивирование патогена и зерновки. В качестве контроля использовали вариант, в котором зерновки культивировали на безгормональной питательной среде и без присутствия патогена.

В качестве стрессового фактора были выбраны разновидности грибов рода *Fusarium* L.: *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum* и *Fusarium sporotrichioides*. Размножение чистой культуры патогенов для получения достаточного количества инокулюма проводили на безгормональной агаризованной питательной среде, содержащей $\frac{1}{2}$ концентрации минеральных солей по прописи Мурасига и Скуга (МС $\frac{1}{2}$) [7]. Грибы выращивали в условиях световой комнаты при температуре 25⁰С, 16-часовом фотопериоде, при интенсивности света 3000 лк (рис. 1).

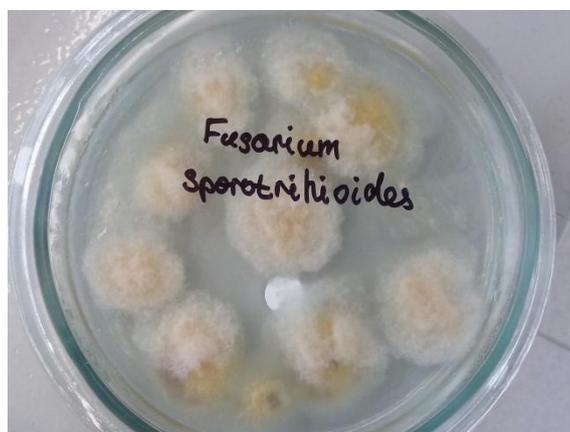


Рисунок 1. Размножение чистой культуры гриба *Fusarium* L. в условиях световой комнаты

Совместное культивирование зерновок тритикале с мицелием исследуемых грибов проводили следующим образом: в центр чашки Петри помещали патоген (0,5×0,5 см), вокруг которого на расстоянии 4 см. располагали зерновки, которые предварительно поверхностно стерилизовали раствором сулемы (0,1%) в течение 10 мин., после чего их трижды промывали стерильной дистиллированной водой (рис.2).

В качестве показателя активизирования защитных функций растения при стрессовых условиях изучали изменение содержания фенольных соединений в проростках тритикале. Для этого из полученных проростков был приготовлен растительный экстракт. Сырую массу надземной части (200-400 мг) проростков растирали в 7 мл 96%-ного этанола до однородной массы и оставляли при комнатной

температуре в тёмном месте на сутки. По истечении времени экстракции образец фильтровали через фильтровальную бумагу в пробирки (рис. 3).



Рисунок 2. Совместное культивирование грибов рода *Fusarium* L. и зерновок тритикале на питательной среде с добавлением регуляторов роста

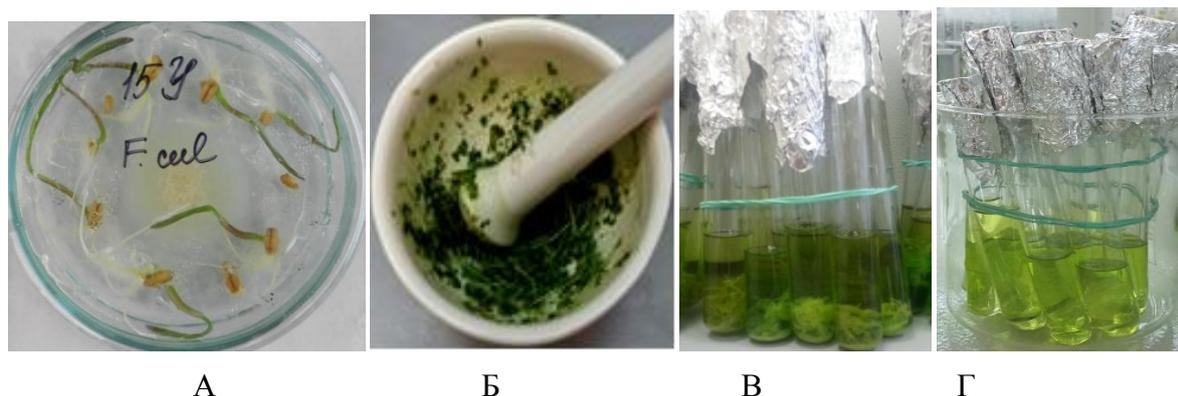


Рисунок 3. Получение экстрактов из молодых проростков: А – исходный материал, Б – гомогенизирование растительного материала, В– экстрагирование, Г– готовый экстракт

Определение суммарного содержания фенольных соединений в полученных экстрактах проводили по следующей методике: в каждую пробирку добавляли по 3 мл дистиллированной воды, после чего добавляли 0,5 мл полученного экстракта и 1 мл содового раствора. Полученный раствор интенсивно перемешивали и добавляли 0,5 мл реактива Фолина-Дениса. Перед определением суммарного содержания фенольных соединений раствор перемешивали.

Содержание фенольных соединений в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 725 нм. Далее по формуле рассчитывали суммарное содержание фенольных соединений в исходном образце:

$$\frac{E_{725} * K(89) * V_{\text{общ.}}}{0,5 * m} = C_{\text{фс}}$$

Где E- показания спектрофотометра

K=89 (const)

Vобщ.- общий объём образца

m- масса растительной навески для экстракта

Эксперименты проводил в трех биологических и 5 аналитических повторностях. На графиках и диаграммах представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения.

3. Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований нами были выявлены некоторые особенностей и корреляционные зависимости: 1) во всех вариантах выявлена тенденция увеличения содержания фенольных соединений в проростках, полученных на средах содержащих регуляторы роста и патоген; 2) этот эффект сильнее проявлялся при применении препарата Иммуноцитифит (рис. 4-6). Возможно, это объясняется содержанием в составе Иммуноцитифита помимо основного действующего вещества и вспомогательных веществ, которые способствуют его эффективности.

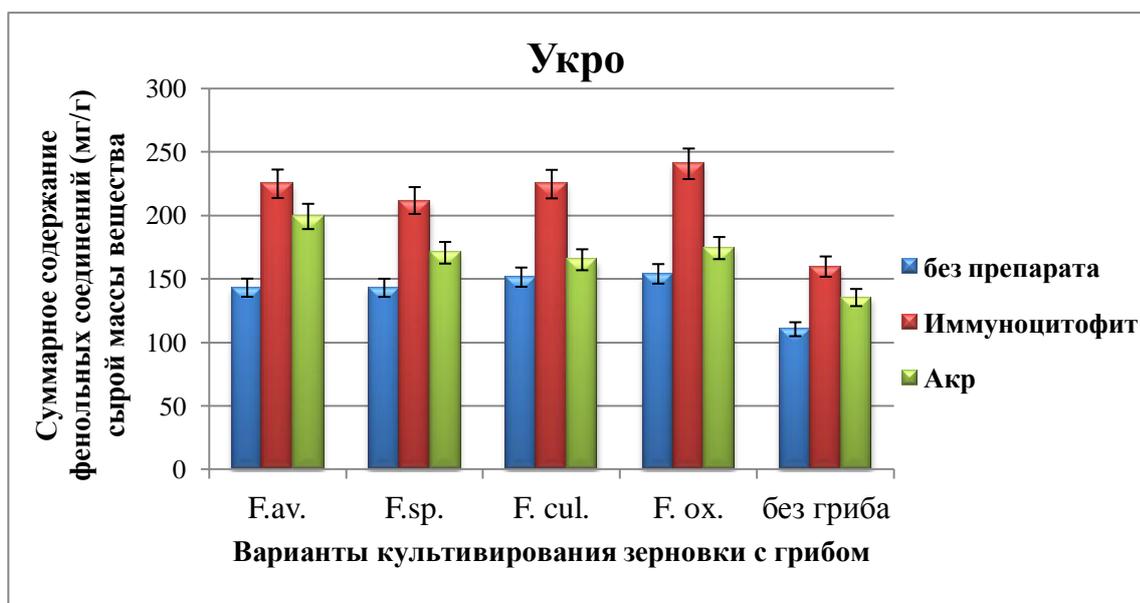


Рисунок 4. Суммарное содержание фенольных соединений в 7-суточных проростках тритикале сорта Укро

F. av. – *Fusarium avenaceum*

F.sp. – *Fusarium sporotrichioides*

F. cul. – *Fusarium culmorum*

F. ox. – *Fusarium oxysporum*

Акр - арахидоновая кислота растительного происхождения

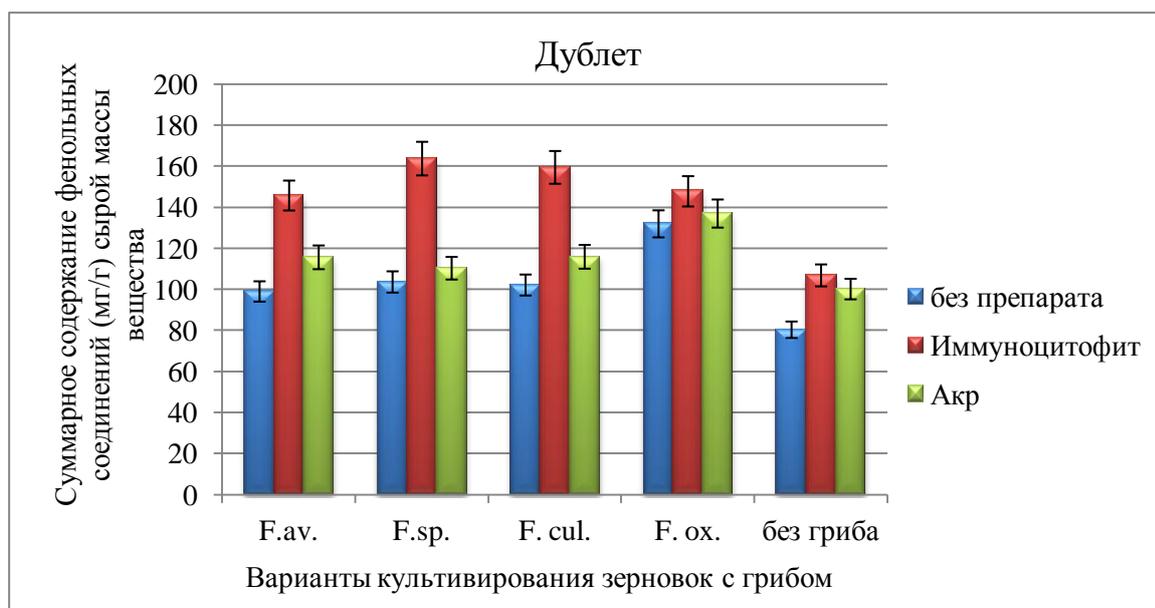


Рисунок 5. Суммарное содержание фенольных соединений в 7-суточных проростках тритикале сорта Дублет

F. av. – *Fusarium avenaceum*

F.sp. – *Fusarium sporotrichioides*

F. cul. – *Fusarium culmorum*

F. ox. – *Fusarium oxysporum*

Акр - арахидоновая кислота растительного происхождения

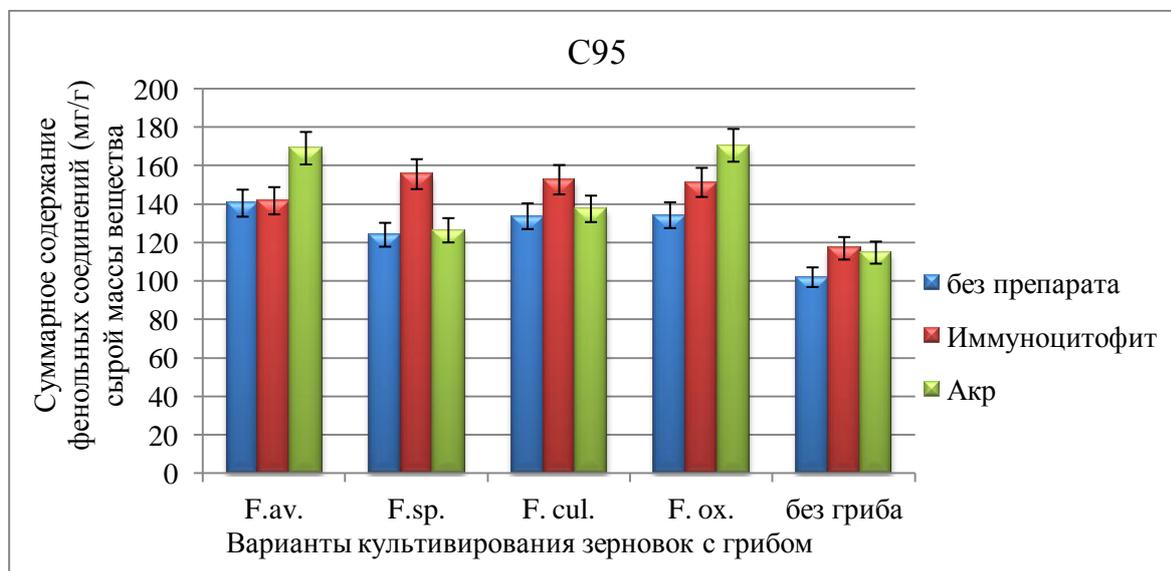


Рисунок 6. Суммарное содержание фенольных соединений в 7-суточных проростках тритикале сортообразца С95

F. av. – *Fusarium avenaceum*

F.sp. – *Fusarium sporotrichioides*

F. cul. – *Fusarium culmorum*

F. ox. – *Fusarium oxysporum*

Акр - арахидоновая кислота растительного происхождения

Согласно литературным данным, полученным на зерновых культурах, устойчивость растений к патогенам часто коррелирует с содержанием в них фенольных соединений [8]. Для наших исследований были выбраны сортообразцы тритикале, характеризующиеся хорошей устойчивостью к фузариозу – Укро, Дублет и С95. Однако, между собой они отличаются по невосприимчивости к данному заболеванию и располагаются в следующем порядке: Укро - невосприимчивый, С95 – средневосприимчивый и Дублет – восприимчивый. В наших исследованиях было установлено, что проростки тритикале сорта Укро во всех вариантах характеризовались более высоким уровнем накопления фенольных соединений, по сравнению с остальными сортообразцами. Меньше всего фенольных соединений было обнаружено у проростков сорта Дублет, который из представленных образцов характеризовался как самый восприимчивый к фузариозу (рис. 7). Таким образом, полученные в ходе биохимического анализа данные, подтверждают теорию о том, что в устойчивых к болезням сортах растений суммарное содержание фенольных соединений превышает те же показатели восприимчивых сортов.

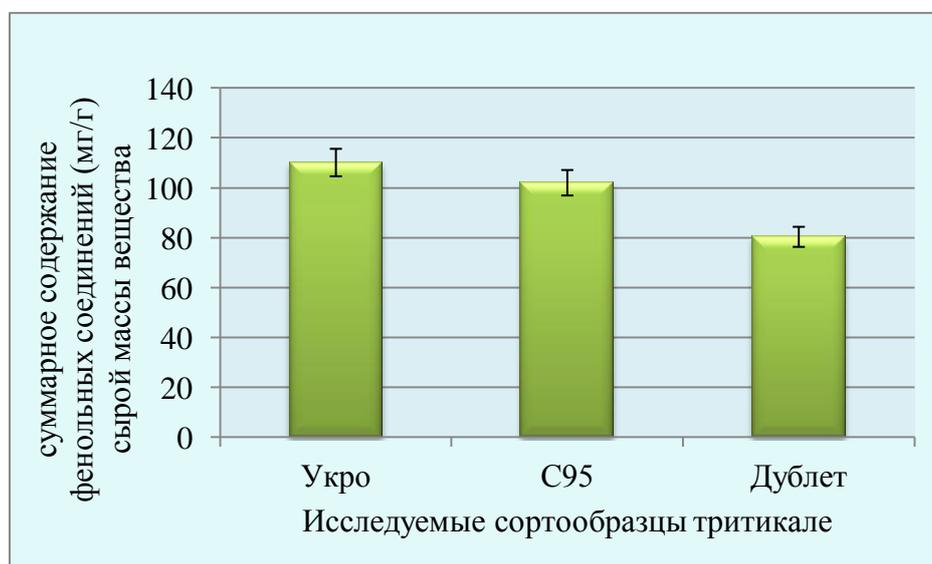


Рисунок 7. Средний показатель содержания фенольных соединений в проростках разных сортов тритикале, характеризующихся различной устойчивостью к инфекции

Исходя из литературных данных и полученным нами результатам, можно предположить, что при попытке поражения патогеном клетки здорового растения, метаболит гриба диффундирует к тканям проростка тритикале и имеет место их взаимодействие. В результате этого взаимодействия происходит образование нового вещества, вторичного метаболита растения, которое диффундирует обратно к грибу и, являясь для него токсичным, подавляет его рост. Иными словами, восприятие растением биотического или абиотического стресса способствует возникновению специального эндогенного сигнала, который приводит в действие защитные механизмы участков растения, в том числе и не контактирующих с патогеном. Они выражаются в интенсификации синтеза фенольных соединений, которые, как известно, участвуют в защите клеток от проникновения патогенов, а также действия их метаболитов.

Представленные в ходе эксперимента данные подтверждают теорию о том, что увеличение содержания фенольных соединений в проростках тритикале является ответом на инфекционный стресс. Действие регуляторов роста, вероятно, направлено

на ускорение активации защитных механизмов растения, что способствует повышению их невосприимчивости к инфекции. Они также способствуют быстрой адаптации растения к стрессовым факторам и возвращению физиологического равновесия. Исследуемые регуляторы роста, помимо ростостимулирующей активности, в определенной концентрации обладают явными иммунными свойствами, что даёт возможность говорить о полифункциональности данных препаратов.

4. Библиографический список

- [1]. Калашникова, Е.А., Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням. Автореферат диссертации, – 38 с. (2003).
- [2]. Калашникова, Е.А., Клеточная инженерия растений. Учебное пособие/Е.А. Калашникова. – М.:РГАУ-МСХА, – 318 с. (2012).
- [3]. Бадина, Г.В. Основы агрономии Г.В., Бадина – Л.:ВО Агропромиздат, – 134 с. (1990).
- [4]. Батуро, С.А., Поражение снежной плесенью и зимостойкость озимого тритикале в Беларуси С.А. Батуро, С.И. Гриб // Земледелие и селекция в Беларуси: Сб. науч. трудов Изис. – Жодино, – Вып.39. – С. 234-237 (2003).
- [5]. Загоскина, Н.В., Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты / Н.В. Загоскина, Е.Б. Бурлакова. – М.: Научный мир, – 400 с. (2010).
- [6]. Запрометов, М.Н., Фенольные соединения и их роль в жизни растения: 56-е 311 Тимирязевское чтение / М.Н. Запрометов. – М.: Наука, – 45 с. (1996).
- [7]. Murashige, T., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* vol. 15. – p. 473-497 (1962).
- [8]. Волынец, А.П., Фенольные соединения в жизнедеятельности растений/А.П. Волынец. – Минск: Беларус. навука, – 283 с. (2013).

Summary

Introduction

The genus *Fusarium* comprises many plant-pathogenic species, causing diseases in the most important agricultural crops, and also can be harmful for humans and animals since many of species produce biologically active secondary metabolites (e.g., phytotoxins and mycotoxins) with an extraordinary chemical diversity. The economic importance of *Fusarium* species is high due to both their impact on crop yields and accumulation of mycotoxins in the colonized crops, which can make food commodities unacceptable for marketing or consumption. Research on *Fusarium*, carried out globally, concentrates the efforts of thousands of scientists and experts in different fields of science: mycology, plant pathology, genetics, agronomy, ecology, chemistry, biochemistry, and toxicology. Despite the efforts of the scientific community, many problems in this area are still not solved. Nowadays, to combat fungal diseases of important crops chemicals are widely used, which is harmful to human and animal health. In certain concentrations plant growth regulators are capable of inhibiting the development of fungi and can be considered as an alternative solution. The paper analyzes the influence of growth regulators on the development of *Fusarium* triticale. Triticale is a crop characterized by high yield, high protein and essential amino acids content that defines its food and fodder importance. Grain triticale is used in baking and confectionery 35 industries, as well as for alcohol and industrial starch production. Also triticale is a valuable crop as the grain and green mass is used for feeding of farm animals. For the study the species of

Fusarium fungi were used, which are most often found on the crops of our region, they are: *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* and *F. avenaceum*. These drugs are environmentally friendly, which is very important when using triticale for human nutrition and animal feed.

The Aim of Research

The research was focused on their correlation with different concentrations of growth regulators dissolved in nutrient medium.

Results and Discussion

In the experiment we have chosen two growth regulator, which differ in their spectrum of action: immunocytophite (ethyl ester of arachidonic acid), Arachidonic acid (from marine algae). For experiment were chosen three triticale accessions (Ukro, Doublet, S95). The accessions differed in susceptibility to fungal diseases and resistance to *Fusarium*. Joint cultivation of triticale grains with mycelium of examined fungi was carried out as follows: in the center of the Petri dishes were placed pathogen (0,5×0,5 cm), around which at a distance of 4 cm had a weevil. The total content of phenolic compounds was determined in 7-day-old triticale seedlings. Experiments conducted in three 5 biological and analytical replicates. The graphs and charts, presents the arithmetic means of definitions and their standard deviations.

Conclusion

The experiments showed that concentrations in some medications can have an inhibitory effect on the development of the fungi and inhibit the development of *Fusarium*. First culture for triticale it is shown that in seedlings, cultivated in vitro, increases the total content of soluble phenolic compounds in response to infectious stress when used as the Immunocytophite and arachidonic acid of plant origin. It is established that the phenolic compounds varies depending on the concentration of the drug and the studied accessions.