

БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АКВАКУЛЬТУРЫ

УДК 581.19:581.2:632.3

ДЕЙСТВИЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АКТИВНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ В ИНФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ

Н.В. Балюк, Т.В. Самович, А.В. Усик, Н.А. Ламан, Ж.Н. Калацкая

Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск

Введение. В высших растениях синтезируются разнообразные низкомолекулярные соединения вторичного метаболизма, в том числе фенольные соединения, которые вносят существенный вклад в многоэтапный процесс защиты растений от различных видов стрессов. Для них характерна высокая способность к взаимодействию с активными формами кислорода (АФК), количество которых возрастает в условиях стресса. Благодаря своей полифункциональности фенольные соединения связаны с процессами роста и развития растений, лигнификацией, фотосинтезом, дыханием и адаптацией к действию стресс-факторов [1]. Одним из ферментов, регулирующих содержание фенольных соединений, является полифенолоксидаза (ПФО), поскольку повышение её активности часто сопровождается снижением уровня этих вторичных метаболитов. Однако взаимосвязь прослеживалась не во всех случаях.

Фитогормоном фенольной природы является салициловая кислота (СК), обладающая функциями сигнального интермедиатора. Реализация защитных эффектов СК обусловлено повышением под ее воздействием содержания АФК, модуляцией работы антиоксидантной системы и увеличением экспрессии стресс-ассоциированных белков.

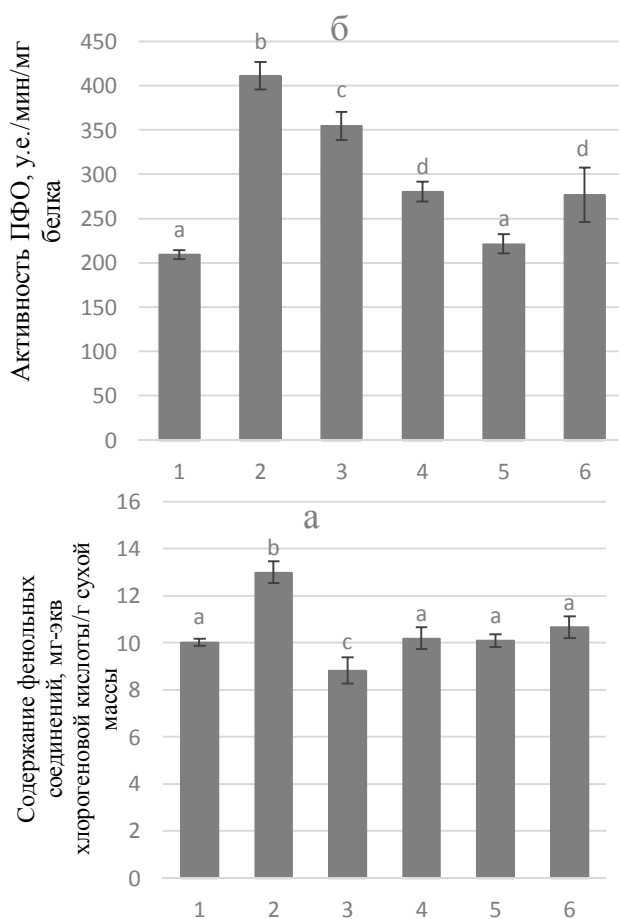
Перспективным экологически безопасным направлением повышения устойчивости растений является применение иммуностимуляторов, запускающих в клетках сигнально-регуляторные каскады реакций, приводящих к активации экспрессии генов, контролирующих биосинтез вторичных метаболитов. Брассиностероиды, метилжасмонат (МеЖ) и СК относятся к числу наиболее широко используемых элиситоров, модулирующих содержание различных фенольных соединений, в т.ч. эндогенной СК.

В связи с этим, цель данной работы – изучение влияния смесей иммуностимуляторов на содержание фенольных соединений, в т.ч. СК и активность ПФО в условиях вирусного заражения.

Материалы и методы. Опыты проведены на клонально микроразмноженных растениях картофеля белорусской селекции сорта Бриз. Культивирование растений-регенерантов осуществляли на торфяном почвогрунте торговой марки Двина при оптимальной влажности почвогрунта и в условиях водного дефицита – 40–45% от полной влагоемкости. Обработку растений проводили путем опрыскивания листовой поверхности эпибрассинолидом (ЭБЛ) в концентрации 10^{-7} моль/л с МеЖ – $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л и/или СК – $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Заражение Y-вирусом картофеля (YVK) осуществляли через 3 сут после обработки иммуностимуляторами. Растения выращивали при температуре 20–21 °С, освещенности 12 000 лк и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) в течение 14 дней после заражения. Затем растительный материал фиксировали в жидком азоте. Суммарное содержание фенольных соединений определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу в пересчете на хлорогеновую кислоту [2], активность ПФО – по изменению оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении пирокатехина за определенный промежуток времени [3], накопление СК – с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Германия) с насосом LPG-3400SD, автосамплером ACC-3000, детектором DAD-3000RS, колонкой Nucleodur C18 Gravity (4,6×250 мм), размер частиц 5 мкм (Macherey-Nagel, Германия) [4].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ «Excel 2010» и «Statistica 7.0». В работе приведены средние статистические значения и их стандартные ошибки. Различия между вариантами оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллеса и считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Достоверно различающиеся значения обозначены буквами латинского алфавита *a, b, c, d*.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что активность ПФО при заражении растений УВК выросла практически в 2 раза, а общее содержание фенольных соединений увеличилось на 30% (рисунок 1). ПФО вовлечена в защиту растений в основном благодаря окислению фенольных соединений и образованию продуктов реакции – хинонов. Кроме того, показано, что в стрессовых условиях в клетке активность ферментов фенолоксидаз возрастает, препятствуя распространению АФК [5]. Так, у зараженных вирусом растений фасоли отмечено увеличение общей активности пероксидазы и ПФО, что коррелировало с тяжестью симптомов [6]. Во всех исследуемых вариантах зафиксировали уменьшение содержания фенольных соединений до уровня их содержания в неинфицированном контроле и активности ПФО по сравнению с инфицированным контролем, что коррелировало с низким уровнем титра вируса в листьях картофеля. Стоит отметить, что при применении ЭБЛ с МеЖ зафиксирована наименьшая индукция ПФО, где она была практически в 2 раза ниже значений, регистрируемых в зараженном контроле и согласуется с максимальной антивирусной активностью в данном варианте. Схожее действие МеЖ на активность ПФО было обнаружено Guan с соавт. [7] на растениях брокколи при поранении. Авторами было установлено, что наиболее оптимальной концентрацией МеЖ является 10 мкм, которая ингибировала активность ПФО, тем самым снижая скорость окисления отдельных фенолов, что способствовало поддержанию высокого уровня фенольных соединений и дальнейшему повышению антиоксидантной активности.

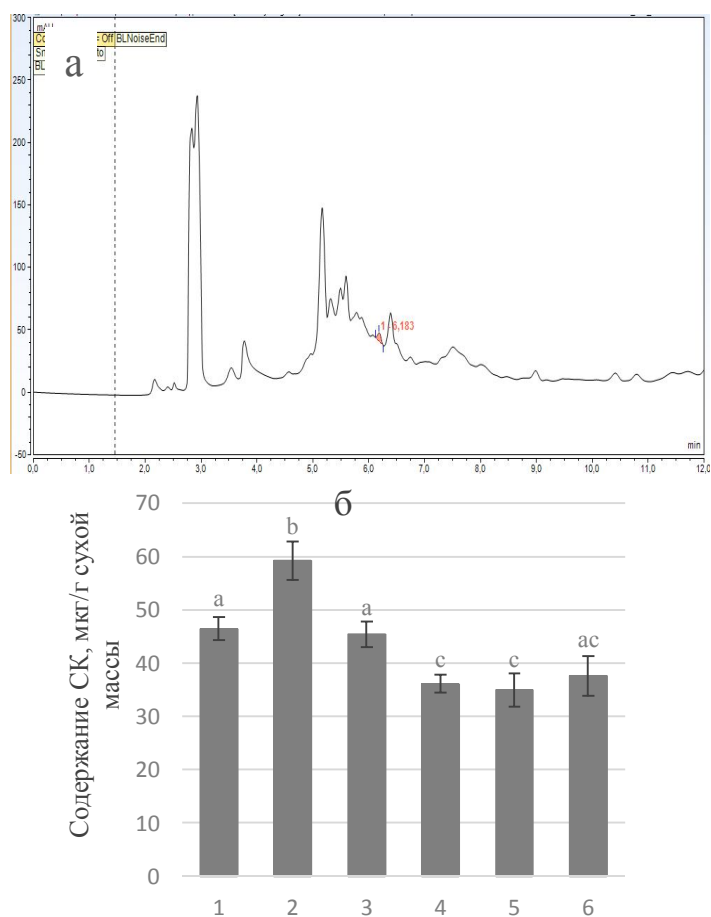


1 – контроль; 2 – УВК; 3 – ЭБЛ; 4 – ЭБЛ+СК; 5 – ЭБЛ+МеЖ; 6 – ЭБЛ+СК+МеЖ

Рисунок 1. – Активность ПФО (а) и содержание фенольных соединений (б) в листьях картофеля на фоне вирусного заражения при обработке растений иммуностимуляторами

Известно, что эндогенная СК синтезируется из фенилаланина, образующегося из хоризмата, с участием различных ферментов, в т.ч. фенилаланинаммонийлиазы [8]. Показано, что вирусное заражение повышает активность фенилаланинаммонийлиазы, что приводит к накоплению эндоген-

ной СК у растений и активации экспрессии СК-регулируемых генов ZmPR1 и ZmPR5 [9]. При этом значительное накопление СК при инфицировании патогеном получило название «салицилатный взрыв» [10]. Наши результаты показали, что заражение листьев YBK вызывает повышение уровня эндогенной СК на 27,6% по сравнению с неинфицированным контролем (рисунок 1), что может быть связано с формированием адаптивных реакций путем индукции АФК и подтверждается наибольшим содержанием H_2O_2 в данной варианте [11]. Сопоставимые результаты были получены на растениях томата, зараженных вирусом пятнистого увядания, где инфицирование индуцировало накопление СК, которая участвовала в генерации АФК и влияла на степень окислительного повреждения [12].



1 – контроль; 2 – YBK; 3 – ЭБЛ; 4 – ЭБЛ+СК; 5 – ЭБЛ+МеЖ; 6 – ЭБЛ+СК+МеЖ

Рисунок 2. – Хроматограмма фенольных соединений при длине волны детектора 254 нм (а) и содержание эндогенной СК (б) в листьях картофеля при обработке иммуностимуляторами в условиях вирусного заражения

Нами установлено, что во всех исследуемых вариантах обработка иммуностимуляторами вызвала снижение содержания эндогенной СК на 23–41%, где ее минимальное количество отмечено при применении композиции ЭБЛ с МеЖ. Аналогичные результаты были получены на растениях сои, где обработка МеЖ повышала солеустойчивость и снижала уровень накопления эндогенной СК [13]. Поскольку при обработке иммуностимуляторами происходило снижение степени вирусного заражения, то в растительном организме не активировались защитные реакции и биохимические показатели иммунного ответа – содержание фенольных соединений и салициловой кислоты, а также активность ПФО находились на уровне, регистрируемых у здоровых растений.

Выводы. Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что вирусное заражение вызывает накопление фенольных соединений, в том числе эндогенной СК и индукцию ПФО. Применяемые иммуностимуляторы способствовали эффективному снижению степени вирусного заражения и активная защитная реакция у обработанных растений не развивалась. Эти результаты демонстрируют, что исследуемые иммуностимуляторы могут модулировать накопление фенольных соединений, тем самым регулируя антиоксидантный статус.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б22М-037).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Tak, Y. Phenolics: A Key Defence Secondary Metabolite to Counter Biotic Stress // Y. Tak, M. Kumar // *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*. – 2020. – P. 309–329.
2. Singleton, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent / V. L. Singleton, J. A. Rossi // *Am. J. Enol. Viticult.* – 1965. – Vol. 16, N 3. – P. 144–158.
3. Бояркин, А. Н. Быстрый метод определения активности полифенолоксидазы (модифицированный) / А. Н. Бояркин // *Тр. Ин-та физиологии растений АН СССР*. – 1954. – Т. 8, № 2. – С. 398–403.
4. Quantification of salicylic acid (SA) and SA-glucosides in *Arabidopsis thaliana*. Bio-protocol / V. Allasia [et al.] // *Bio-protocol LCC*. – 2018. – Vol. 8, № 10. – P. 1–8.
5. Активность полифенолоксидазы в хвое ели голубой (*Picea pungens*) и картофеле (*Solanum tuberosum*) как фиотиндикационный маркер состояния окружающей среды / А. Г. Шубина [и др.] // *Вестник российских университетов. Математика*. – 2012. – Т. 17, № 1 – С. 347–348.
6. Studies On Bean Yellow Mosaic Virus Infecting Some Leguminous Crops In Egypt / S. El-Helaly [et al.] // *Egyptian Journal of Crop Protection*. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 1–9.
7. Effect of methyl jasmonate on phenolic accumulation in wounded broccoli / Guan Y. et al. *Molecules*. – 2019. – Т. 24. – №. 19. – С. 3537.
8. Пашкевич, Л. В. Роль салициловой кислоты в формировании системной приобретенной устойчивости растений / Л. В. Пашкевич, Л. Ф. Кабашникова // *Вісник ХНАУ*. – 2018. – Т. 3, № 45. – С. 31–48.
9. Maize phenylalanine ammonia-lyases contribute to resistance to Sugarcane mosaic virus infection, most likely through positive regulation of salicylic acid accumulation / W. Yuan [et al.] // *Molec. Plant Pathology*. – 2019. – Vol. 20, № 10. – P. 1365–1378.
10. Тарчевский, И. А. Индукция салициловой кислотой компонентов олигомерных белковых комплексов / И. А. Тарчевский, В. Г. Яковлева, А. М. Егорова // *Физиология Растений*. – 2012. – Т. 59, № 4. – С. 532–542.
11. Балюк, Н. В. Защитные реакции инфицированных вирусом у растений картофеля при обработке 24-эпибрассинолидом с салициловой кислотой и метилжасмонатом / Н. В. Балюк, Ж. Н. Калацкая, Н. А. Ламан // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 2023. – Т. 68, № 2. – С. 95–103. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-95-103>
12. Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus / M.P. López-Gresa [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 11. – P. e0166938–1–25.
13. The cooperation between methyl jasmonate and salicylic acid to protect soybean (*Glycine max L.*) from salinity / B. Seckin-Dinler [et al.] // *Fresenius Environmental Bulletin*. – 2018. – Vol. 27, № 3. – P. 1618–1626.