

На правах рукописи



ЛАВРОВА
Виктория Витальевна

**РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА КРАТКОВРЕМЕННЫЕ
НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ОБРАБОТКИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ
НЕМАТОДОЙ: ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ**

03.01.05 — «Физиология и биохимия растений»

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН)

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Сысоева Марина Ивановна

Официальные оппоненты: **Шнеер Виктория Семеновна**
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова
Российской академии наук,
ведущий научный сотрудник

Гончарова Эльза Андреевна
доктор биологических наук, профессор,
ГНУ Всероссийский Научно-Исследовательский
Институт Растениеводства им. Н.И. Вавилова
Российской академии
сельскохозяйственных наук,
главный научный сотрудник

Ведущая организация: Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева

Защита состоится **30 мая 2012 г.** в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Тел. (812) 346-47-06, факс (812) 346-36-43.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук

Автореферат разослан “___” апреля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



О. С. Юдина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Растения в природе постоянно подвергаются действию широкого круга стрессовых факторов – абиотических и биотических. В связи с этим проблема адаптации к комплексному действию факторов разной природы является одной из важных в физиологии растений и находится в фокусе многих современных научно-исследовательских программ. Среди факторов, воздействующих на растения, особое место занимают температура и заражение паразитами.

Выращивание растений картофеля на Севере происходит в условиях нестабильного температурного режима, характеризующегося резкими колебаниями температур в суточном цикле. Помимо этого растения на ранних этапах онтогенеза подвержены заражению различными видами патогенов. В настоящее время одним из наиболее распространенных и высоковредоносных паразитов картофеля является эндопаразит корневой системы – картофельная цистообразующая нематода (*Globodera rostochiensis* Woll.), снижающая урожай на 30-60% и ухудшающая качество клубней (Тихонова и др., 1999; Матвеева, 2004).

В процессе эволюции растения выработали защитные механизмы, позволяющие им противостоять неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Так, формирование низкотемпературной устойчивости растений обеспечивается изменениями в экспрессии генов, в частности, COR генов (Колесниченко, Войников, 2003; Трунова, 2007; Thomashow, 1998). Существенное значение имеют изменения степени ненасыщенности жирных кислот липидов, которые позволяют поддерживать текучесть мембран и предотвращать фазовый переход липидов (Лось, 2001; Lyons, Raison, 1973). Не вызывает сомнений и существенная роль фотосинтеза для адаптации растений к низким температурам (Суворова, 2009; Levitt, 1980). В развитии устойчивости к паразитам важную роль играют гены устойчивости (*R* гены) и метаболический статус растения (Williamson et al., 1996; Huang, 2004). Известно, что температура способна изменять иммунный ответ растений на заражение, но молекулярные механизмы остаются пока мало изученными.

Несмотря на большое количество экспериментальных данных, подтверждающих функционирование в растениях общих систем устойчивости к двум или нескольким факторам различной природы (Кузнецов и др., 1990), механизмы кросс-адаптации, в частности, к действию низкотемпературных обработок и заражению облигатным паразитом, остаются до сих пор не исследованными. В литературе представлены многочисленные данные по влиянию кратковременных ежесуточных снижений температуры на морфометрические показатели растений, а также показана их роль в повышении холодоустойчивости (Марковская, Сысоева,

2004; Мое, Heins, 2000). Однако данные о реакциях растений картофеля на комплексное действие кратковременных ежесуточных снижений температуры и заражение нематодой отсутствуют.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в изучении физиолого-биохимических реакций растений картофеля на действие кратковременных ежесуточных снижений температуры (ДРОП) и заражение нематодой, а также в выявлении возможных механизмов кросс-адаптации к действию абиотического и биотического факторов.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние ДРОП на процессы роста и развития растений при заражении *G. rostochiensis*;

2. Исследовать влияние ДРОП на состояние фотосинтетического аппарата растений при заражении *G. rostochiensis*;

3. Изучить изменение содержания и состава жирных кислот общих липидов в листьях растений при действии ДРОП;

4. Исследовать уровень экспрессии холодоиндуцируемых генов и генов устойчивости к заражению *G. rostochiensis* при действии ДРОП;

5. Изучить влияние предпосадочной ДРОП-обработки семенных клубней на продуктивность растений и качество урожая картофеля при заражении почвы *G. rostochiensis*.

Научная новизна работы. В результате проведенного исследования получены новые оригинальные данные, углубляющие представления о реакции растений картофеля на комплексное действие абиотического и биотического факторов. Впервые показано, что кратковременные ежесуточные снижения температуры вызывают эффект кросс-адаптации, связанный с повышением холодоустойчивости растений и устойчивости к заражению нематодой. Установлено, что кратковременные периодические низкотемпературные воздействия приводят к экспрессии *COR* гена *ci7* в листьях картофеля и увеличивают уровень ненасыщенности жирных кислот липидов. Впервые установлено, что ДРОП-обработка является для растения праймингом, способствующим повышению его жизнеспособности и активации защитных реакций в ответ на заражение нематодой, приводя к экспрессии гена устойчивости *HI* и развитию системной устойчивости растений. Выдвинуто предположение, что одним из возможных молекулярных механизмов устойчивости может служить вызываемое суточным температурным перепадом ремоделирование хроматина, которое, в свою очередь, приводит к активации генов устойчивости.

Практическая значимость работы. Результаты могут быть рекомендованы для разработки новых способов повышения устойчивости

растений картофеля к заражению нематодой, основанных на применении периодических кратковременных низкотемпературных обработок. Кроме того, они могут быть использованы при чтении спецкурсов по физиологии растений и фитонематологии.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены и обсуждались на XV школе «Актуальные проблемы биологии развития» (Звенигород, 2008); Международных курсах аспирантов «Методы физиологии растений» (Орхус, Дания, 2009); Годичном собрании общества физиологов растений и Международной научной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» (Апатиты, 2009); 13-й Международной Пушкинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009); Международном симпозиуме «Nematodes in Tropic Ecosystems» (Ханой, Вьетнам, 2009); Международной научной конференции «Plant and Microbe Adaptation to the Cold» (Ос, Норвегия, 2009); XVII Конгрессе федерации Европейских обществ биологов растений (FESPB) (Валенсия, Испания, 2010); Всероссийской конференции «Растение и стресс» (Москва, 2010); конкурсе на лучший инновационный проект по программе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса (У.М.Н.И.К.)» (Петрозаводск, 2011); 9-м симпозиуме Российского общества нематологов с международным участием «Нематоды естественных и трансформированных экосистем» (Петрозаводск, 2011); Международной конференции «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); 18-ой конференции Европейской ассоциации исследователей картофеля (Оулу, Финляндия, 2011); Школе молодых ученых, посвященной 65-летию КарНЦ РАН «Фундаментальная и прикладная наука в Республике Карелия: современное состояние и перспективы развития» (Петрозаводск, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 3 – в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 306 наименований, в том числе 216 на иностранном языке. Работа изложена на 131 странице, содержит 22 рисунка и 21 таблицу.

Диссертационная работа выполнялась в 2008-2011 гг. в соответствии с планом НИР ИБ КарНЦ РАН, являясь частью плановых тем «Структурно-функциональные аспекты устойчивости и адаптации растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды» (№ гос. рег. 01.2.00 851647) и «Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы реакции растений на действие неблагоприятных температур и

тяжелых металлов» (№ гос. рег. 01201166444), а также частично поддержана грантами РФФИ № 08-04-98833-р_север, № 10-04-00097_а и проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (№ г.к. П1299).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В главе представлен обзор исследований по влиянию переменных суточных температур и заражения паразитами на физиолого-биохимические показатели растений картофеля. Рассмотрены основные механизмы ответных реакций растений на действие низкой температуры и заражения.

ГЛАВА 2. Объект и методы исследования

Опыты проводили на растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), различающихся по устойчивости к заражению картофельной цистообразующей нематодой (*Globodera rostochiensis* Woll.): сорте Сударыня – устойчивом и сорте Невском – восприимчивом к заражению нематодой. Эксперименты выполнены в камерах искусственного климата и в полевых условиях на опытных участках Агробиологической станции ИБ КарНЦ РАН. Мини-клубни картофеля и клубни элита приобретены в ГНУ «Карельская государственная сельскохозяйственная опытная станция Россельхозакадемии».

Эксперименты в камерах искусственного климата. Растения, полученные из мини-клубней устойчивого и восприимчивого сортов, выращивали в камерах искусственного климата при освещенности 10 клк, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч, температуре воздуха 23°C. По достижении фазы 3-х листьев часть растений каждого сорта оставляли при 23°C (вариант контроль), а остальные в течение 6 сут подвергали ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5°C) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП), либо выращивали при постоянной низкой температуре 5°C (вариант ПНТ). По окончании температурных обработок проводили анализ морфометрических показателей, холодоустойчивости, жирнокислотного состава общих липидов, определяли уровень экспрессии *COR* и *R* генов, содержание фотосинтетических пигментов, показатели флуоресценции хлорофилла. На следующий день после завершения температурных обработок часть растений каждого варианта заражали нематодой (10 цист/растение), а часть оставляли незараженными. Далее здоровые и зараженные растения каждого варианта выращивали 1,5 месяца в оптимальных условиях. В течение этого периода измеряли высоту растений, подсчитывали количество листьев, определяли холодоустойчивость, со-

держание фотосинтетических пигментов, показатели флуоресценции хлорофилла. По завершению эксперимента у растений всех вариантов определяли сырую массу надземных и подземных органов. У части зараженных растений срезали надземные органы, а сосуды с корнями в песчаном субстрате оставляли в камере на 1 месяц до завершения жизненного цикла нематоды, после чего проводили подсчет цист на корнях растений и в прикорневой зоне.

Эксперименты в полевых условиях. В полевых условиях работа выполнена на клубнях элита восприимчивого к заражению нематодой сорта Невский. Для проведения исследований было заложено 2 экспериментальных участка с выровненным микрорельефом площадью 20 м² каждый, с последовательным размещением вариантов. Почва дерново-подзолистая, суглинистая. Опыт проводили с использованием общепринятых для северо-западного региона агротехнических приемов. Естественный фон заражения почвы нематодой составлял 21 циста/ 100 г почвы, что соответствует средней степени заражения. Клубни проращивали стандартным способом на свету, после чего часть из них оставляли при температуре 23°C (вариант контроль), а остальные подвергали в течение 6 сут ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5°C) на 2 ч (вариант ДРОП). На следующий день после завершения температурных обработок клубни всех вариантов высаживали в почву. Через 75-80 дней после посадки определяли сырую массу надземных и подземных органов. По окончании эксперимента (90 дней после посадки) измеряли массу клубней, определяли содержание в них крахмала и витамина С и оценивали зараженность растений цистами нематоды.

Сухую массу растений и органов измеряли путем высушивания в термостате при 105°C до постоянного веса и взвешивания на аналитических весах GR-200 (AND, Япония).

Содержание фотосинтетических пигментов определяли в спиртовых экстрактах на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) с последующими расчетами по (Lichtenthaler, Wellburn, 1983).

Флуоресценцию хлорофилла измеряли с помощью портативного флуориметра с импульсно-модулированным освещением MINI-PAM (Walz, Германия), руководствуясь инструкцией производителя и работами (Корнеев, 2002; Lichtenthaler, Vabani, 2004). Измерения проводили на 3-м сверху полностью развернувшемся листе растений, предварительно адаптированных в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Определяли следующие параметры индуцированной флуоресценции хлорофилла: F_v/F_m – максимальный квантовый выход фотохимической активности ФСII; $\Phi_{ФСII}$ – реальный квантовый выход ФСII; qP – коэффициент фотохимического тушения флуоресценции;

NPQ – коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции; ETR – скорость транспорта электронов в ЭТЦ.

О холодоустойчивости растений судили по реакции клеток высечек из листьев на 5-мин промораживание в термоэлектрическом термостате ТЖР-02/-20 («Интерм», Россия). В качестве критерия холодоустойчивости использовали температуру гибели 50% палисадных клеток паренхимы (LT_{50}), определяемую по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы (Дроздов и др., 1976).

Содержание крахмала и витамина С в клубнях определяли удельно-весовым способом (Прищепина, 2007) и методом Мурри (Воскресенская и др., 2008).

Определение содержания и состава жирных кислот общих липидов проводили методом газожидкостной хроматографии (Цыдендамбаев, Верещагин, 1980; Пчелкин и др., 2001) на приборе «Хроматэк Кристалл-5000.1» (Россия).

Наличие и уровень экспрессии R генов (генов устойчивости к нематоде *H1* и *Grol-4*) и **COR гена** (гена холодоустойчивости *ci7*) в листьях анализировали методом аллель-специфической ПЦР и ПЦР в режиме реального времени.

Паразитологические методы. Жизнеспособность личинок нематоды определяли по методу Шеферда (Shepherd, 1962). Заражение растений осуществляли цистами нематоды путем внесения их в прикорневую зону через углубления, сделанные на поверхности песка. Зараженность растений нематодой оценивали по численности самок нового поколения. Для этого цисты выделялись из песчаной культуры методом Сейнхорста (Seinhorst, 1964). Отбор почвенных образцов на экспериментальных участках в полевом опыте проводили согласно «Инструкции по выявлению бледной и золотистой картофельных нематод и мерам борьбы с ними» (1988).

Данные обработаны с использованием стандартных статистических методов. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения из 2-3-х независимых опытов и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними оценивали с помощью критерия Стьюдента (при $P \leq 0,05$).

ГЛАВА 3. Реакция растений картофеля на кратковременные ежесуточные снижения температуры и заражение нематодой

Устойчивость растений. Низкотемпературные обработки повысили холодоустойчивость как у устойчивого, так и у восприимчивого к заражению нематодой сорта картофеля (рис. 1). При этом прирост устойчивости после кратковременных низкотемпературных воздействий был на 2° выше,

чем после постоянного действия низкой температуры и более длительное время сохранялся на высоком уровне в последствии (рис. 2), что согласуется с ранее полученными данными для других видов растений (Sysoeva et al., 2005). Заражение нематодой восприимчивого сорта картофеля способствовало повышению его холодоустойчивости, причем в сочетании с кратковременными низкотемпературными обработками наблюдался аддитивный эффект (рис. 2).

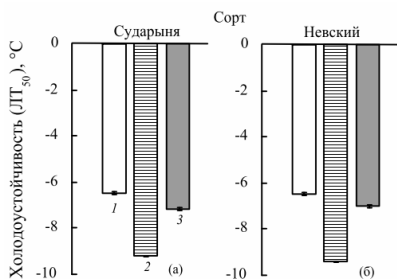


Рис. 1. Холодоустойчивость устойчивого (а) и восприимчивого (б) к заражению нематодой сортов картофеля при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закалывающей температуры (5°C).

1 – контроль, 2 – ДРОП, 3 – ПНТ

Анализ заражения растений нематодой показал, что количество цист у растений устойчивого к заражению нематодой с. Сударыня не превышало исходного уровня заражения (10 цист/раст.) (рис. 3а), что свидетельствует об отсутствии размножения нематоды вследствие развития реакции сверхчувствительности. В то же время на корнях контрольных растений восприимчивого с. Невский средний уровень заражения превысил 100 цист/раст. Однако ДРОП-обработка растений этого сорта снизила уровень заражения на 75% (рис. 3б). Аналогичный эффект отмечен и при постоянном действии низкой температуры, хотя уровень заражения по сравнению с контролем снизился только на 25% (рис. 3б). Эффект снижения заражения отмечался только в том случае, когда ДРОП-обработку растений проводили до заражения. Низкотемпературная обработка растений после заражения нематодой не оказала влияния на процессы размножения паразита: количество цист на корнях растений, обработанных ДРОП и ПНТ, было сопоставимо с контролем (рис. 3б).

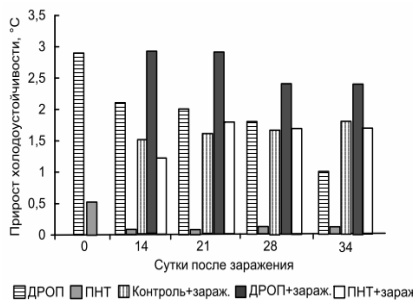


Рис. 2. Прирост холодоустойчивости восприимчивого к заражению нематодой с. Невский в последствии кратковременных (ДРОП) и постоянных (ПНТ) снижений температуры и при заражении нематодой

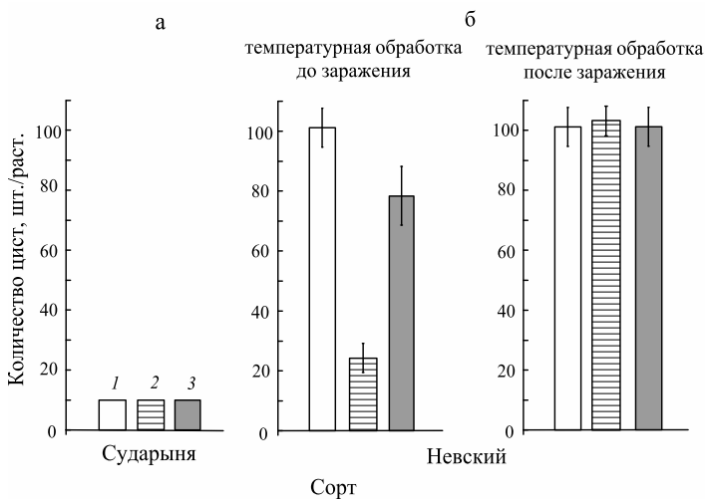


Рис. 3. Уровень заражения нематодой устойчивого (а) и восприимчивого (б) к заражению нематодой сортов картофеля при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закалывающей температуры (5°C). Исходный уровень заражения – 10 цист/раст.

1 – контроль, 2 – ДРОП, 3 – ПНТ

Полученные результаты свидетельствуют о развитии у растений картофеля сопряженной устойчивости к низкой температуре и биотрофному паразиту под действием ДРОП.

Рост и развитие растений. Заражение нематодой не повлияло на скорость развития растений обоих сортов, но спустя 3 недели вызвало некоторое торможение роста у растений восприимчивого сорта (рис. 4), что является характерным признаком заражения нематодой (Соловьева и др., 1980). Однако после кратковременной низкотемпературной обработки растения восприимчивого к заражению фитопаразитом сорта проявили реакцию, сходную с устойчивым сортом, и ингибирующий эффект заражения проявился лишь через 45 сут после заражения (рис. 4). Заражение восприимчивых растений не повлияло на накопление биомассы, но изменило соотношение наземных и подземных органов в сторону увеличения доли корней (рис. 5). Последнее обычно происходит преимущественно за счет развития мощных боковых корней при заражении нематодой (Fatemy, Evans, 1986). В то же время при ДРОП-обработке, предшествовавшей заражению, изменения соотношения биомасс надземной части и корней не наблюдали (рис. 5).

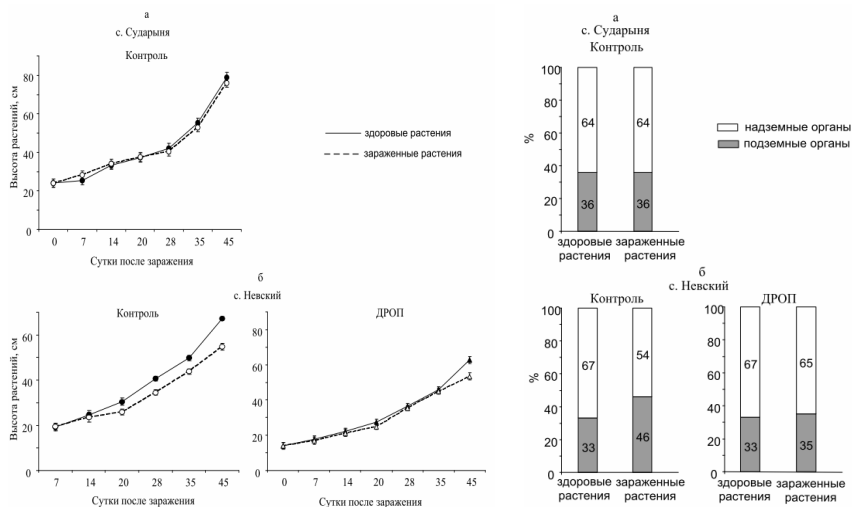


Рис. 4. Влияние заражения нематодой на высоту растений устойчивого (а) и восприимчивого (б) к заражению нематодой сортов картофеля

Рис. 5. Влияние заражения нематодой на соотношение биомассы надземных и подземных органов устойчивого (а) и восприимчивого (б) к заражению нематодой сортов картофеля (45-е сут после заражения)

Таким образом, ДРОП-обработка способствовала уменьшению негативного влияния заражения на ростовые процессы у растений.

Состояние фотосинтетического аппарата. Заражение не оказало влияния на содержание пигментов в листьях устойчивого сорта, но вызвало повышение уровня зеленых пигментов к 20-м суткам у восприимчивых растений (рис. 6). В этот период отмечено также повышение функциональной активности ФСII (рис. 7). Вероятно, такая реакция обусловлена характером взаимоотношений между растением и паразитом. Личинки нематоды на ранних этапах развития (до 20-х сут) активно потребляют питательные вещества из растения-хозяина, что, по принципу обратной связи, может поддерживать фотосинтетическую функцию (Соловьева и др., 1980). При переходе паразита к процессу размножения (20-45-е сутки), его трофическая зависимость от растения-хозяина снижается, что приводит к проявлению негативного влияния заражения. У ДРОП-обработанных растений при заражении отмечено снижение содержания зеленых пигментов к 20-м суткам, после чего их содержание восстанавливается до уровня контроля (рис. 6).



Рис. 6. Влияние заражения нематодой на содержание зеленых пигментов в листьях устойчивого (а) и восприимчивого (б) сортов картофеля (с. Сударыня: 100% = 9,5 мг/г сух. массы для контроля; с. Невский: 100% = 9,9 мг/г сух. массы для контроля и 10,1 мг/г сух. массы для ДРОП)

В реакции фотосинтетического аппарата на заражение нематодой у растений картофеля, обработанных ДРОП, можно выделить два этапа: первый (до трех недель), когда отсутствуют видимые нарушения на уровне фотохимических реакций, вызванные заражением, и второй этап (до полутора месяцев), когда выявляются нарушения в работе фотосинтетического аппарата (рис. 7).

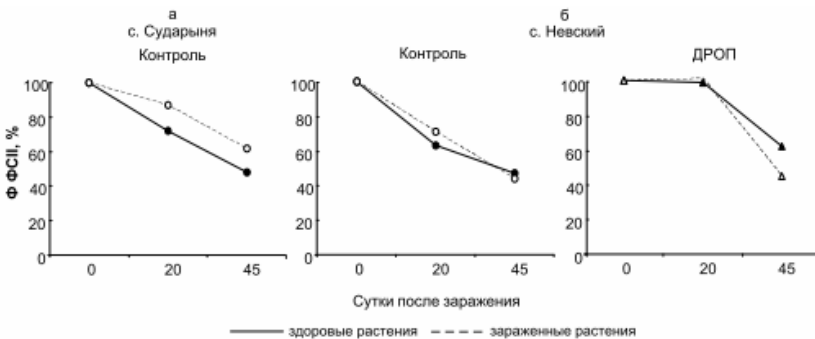


Рис. 7. Влияние заражения нематодой на величину реального квантового выхода ФСII (Φ ФСII) в листьях устойчивого (а) и восприимчивого (б) сортов картофеля (с. Сударыня: 100% = 0,671 для контроля; с. Невский Φ ФСII; 100% = 0,703 для контроля и 0,714 для ДРОП)

Полученные результаты, с нашей точки зрения, обусловлены высоким метаболическим статусом растений при действии ДРОП, связанным с повышением уровня гексоз (Марковская и др., 2010). С одной стороны гексозы в условиях заражения способны оказывать ингибирующее влияние на активность генов, ответственных за биосинтез (Bilgin et al., 2010) и/или активируют гены деградации фотосинтетических пигментов (Kariola et al., 2005), что, вероятно, может приводить к снижению их содержания. С другой стороны, высокий уровень гексоз позволяет растениям находиться в активном функциональном состоянии, что, по-видимому, может способствовать росту и развитию растения при паразитировании на нем личинок нематоды.

Жирнокислотный состав общих липидов. Установлено, что исследуемые сорта на фоне сходного качественного жирнокислотного состава общих липидов листьев имеют количественные различия в содержании некоторых жирных кислот (ЖК). Так, для растений устойчивого к заражению сорта по сравнению с восприимчивым характерно более высокое содержание ненасыщенных кислот, а именно 18:2(n-6) и 18:3(n-3), и низкий уровень насыщенных ЖК (рис. 8). Согласно современным исследованиям (Kachroo et al., 2004; Walters et al., 2004) жирнокислотный состав во многом определяет устойчивость растений к заражению фитопатогенами, в частности, низкое содержание 18:1(n-9) кислоты и высокий уровень 18:2(n-6) и 18:3(n-3) кислот способствуют активации *R* генов (генов устойчивости), ответственных за распознавание внедрения паразита и развитие реакции сверхчувствительности, а также принимают участие в формировании системной приобретенной устойчивости за счет активации салицил-зависимых защитных PR генов (Upchurch, 2008). Таким образом, основываясь на полученных результатах и литературных данных, можно предположить, что количественные различия в жирнокислотном составе общих липидов между сортами обусловлены различной их устойчивостью к паразиту. Кроме того, выявлено отсутствие изменений жирнокислотного состава растений устойчивого к заражению сорта при действии пониженных температур, что связано с высоким уровнем ненасыщенности общих липидов. Полученный результат подтверждается данными литературы, свидетельствующими о том, что растения устойчивые к заражению паразитами являются устойчивыми и к действию низкой температур (Gaudet et al., 2011).

Нами показано, что ДРОП-обработка восприимчивых растений вызвала повышение ненасыщенных жирных кислот до уровня сопоставимого с устойчивым сортом. Таким образом, кратковременные ежесуточные снижения температуры за счет снижения 18:0 и 18:1(n-9) кислот и повышения 18:2 (n-6) и 18:3(n-3) ЖК может способствовать поддержанию

структурно-функциональной стабильности мембран хлоропластов (Liu et al., 2008) и митохондрий (Чиркова, 1997) в условиях действия пониженных температур, и подготавливают растения к последующему заражению нематодой, за счет активации *R* генов, что позволяет им воспринимать внедрение паразита и развивать защитные реакции.

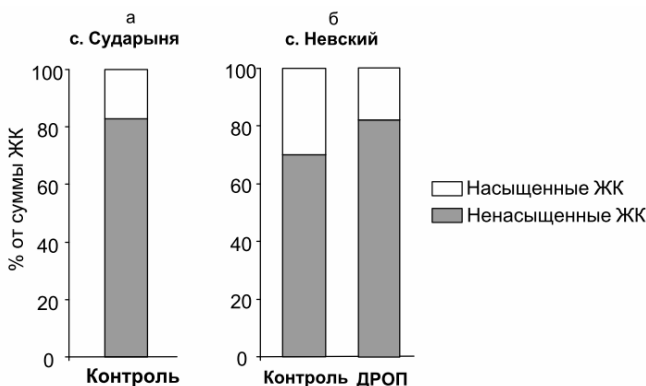


Рис. 8. Содержание (%) насыщенных и ненасыщенных ЖК липидов в листьях устойчивого (а) и восприимчивого (б) к заражению нематодой сортов картофеля

Таким образом, процессы, которые возникают в результате перехода от умеренных к субоптимальным температурам, не оказывающим повреждающего действия на растения, обеспечивают предварительную обработку (прайминг) растений и подготавливают их к последующим стрессовым условиям

Как правило, активация защитных реакций у растения является энергозатратным процессом, что сказывается на снижении его жизнеспособности (Bolton, 2009; Alcázar, Parker, 2011). Именно такую реакцию мы наблюдали в нашем исследовании по ряду физиологических показателей у растений восприимчивого сорта, в частности торможение роста растений и снижение биомассы надземных органов. В то же время заражение нематодой растений устойчивого сорта не вызвало каких-либо нарушений в физиологических реакциях растений. Интересно, что после кратковременных низкотемпературных обработок растения восприимчивого к заражению фитопаразитом сорта проявили реакцию по целому комплексу физиологических и биохимических показателей, сходную с устойчивым сортом. В частности, ДРОП-обработка позволила в условиях заражения сохранить ростовые процессы и соотношение биомасс надземных и подземных органов на уровне контроля, а также способствовала повышению активности ФСЦ. Кроме того, кратковременные ежедневные

снижения температуры восприимчивых растений изменили соотношение жирных кислот до уровня, сопоставимого с таковым у устойчивых растений, что обусловило не только поддержание жидкости мембран, необходимой для устойчивости к низким температурам, но и подготовку растения к последующему заражению нематодой за счет участия ЖК в сигнальных путях, ведущих к активации генов устойчивости.

ГЛАВА 4. Механизмы кросс-адаптации растений картофеля

Установлено, что не только постоянное низкотемпературное воздействие, но и кратковременные периодические снижения температуры вызвали экспрессию COR гена *ci7* в листьях картофеля (рис. 9). Причем, если для достижения максимального уровня экспрессии гена *ci7* при ПНТ требовалось 72 ч низкотемпературного воздействия (Berkel et al., 1994; Kirch et al., 1997), то при периодической кратковременной низкотемпературной обработке подобный эффект достигался уже при 12-часовом суммарном действии низкой температуры (6 сут по 2 ч).

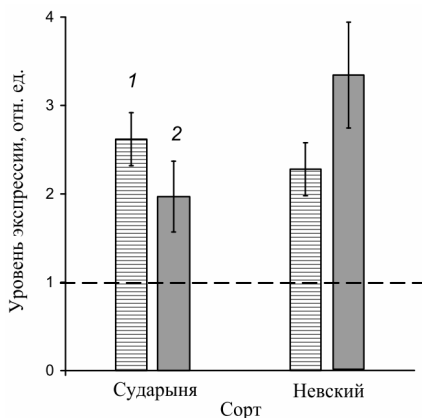


Рис. 9. Изменение уровня экспрессии COR гена *ci7* при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закалывающей температуры (5°C) в листьях устойчивого (с. Сударыня) и восприимчивого (с. Невский) к заражению нематодой сортов картофеля. Уровень экспрессии генов у контрольных растений (при 23°C) принят за единицу

1 – ДРОП, 2 – ПНТ

Устойчивость растений картофеля к заражению нематодой опосредуется двумя *R* генами – *H1* и *Gro1-4* (Skuripova et al., 2002, Gebhardt et al., 2006). Проведенный аллель-специфический ПЦР анализ показал присутствие в

генотипах устойчивого и восприимчивого растений генов *HI* и *Gro1-4*. Однако, если у растений устойчивого сорта данные гены находятся в активном состоянии и экспрессируются на низком уровне, что является необходимым для быстрого развития защитных реакций при внедрении паразитов (Williamson et al., 2006), то у восприимчивого сорта они неактивны, в результате чего растения подвержены заражению (Skupinova et al., 2002) (табл. 1).

Таблица 1

Уровень экспрессии генов устойчивости *HI* и *Gro1-4* в листьях устойчивого (с. Сударыня) и восприимчивого (с. Невский) сортов картофеля по сравнению с экспрессией гена актина при 23°C

Ген	Уровень экспрессии, отн. ед.	
	с. Сударыня	с. Невский
<i>HI</i>	0,100±0,030	0
<i>Gro1-4</i>	0,060±0,050	0

Нами установлено, что ДРОП-обработка восприимчивых к заражению растений повышает уровень экспрессии гена *HI* в листьях. В то же время экспрессия гена *Gro1-4* не изменяется (рис. 10)

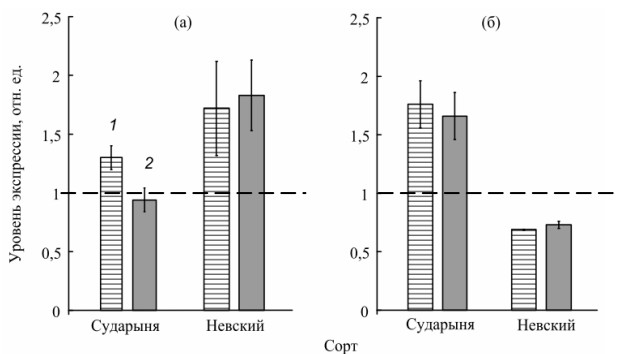


Рис. 10. Изменение уровня экспрессии генов устойчивости *HI* (а) и *Gro 1-4* (б) при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закалывающей температуры (5°C) у устойчивого (с. Сударыня) и восприимчивого (с. Невский) к заражению сортов картофеля. Уровень экспрессии генов у контрольных растений (при 23°C) принят за единицу

1 – ДРОП, 2 – ПНТ

Таким образом, проведенное исследование показало, что кратковременные ежесуточные низкотемпературные воздействия вызывают эффект кросс-адаптации, в основе которого лежат молекулярные механизмы, свя-

занные с повышением экспрессии гена устойчивости к нематоде *Н1*. Этот ген кодирует рецепторные белки, функции которых заключаются в распознавании метаболитов нематоды и активации сигнальных систем, направленных на запуск защитных реакций, в том числе реакции сверхчувствительности (Воронкова и др., 2007; Hammond-Kosack, Kanyuka, 2007).

ГЛАВА 5. Практическое применение предпосадочной обработки клубней картофеля кратковременными снижениями температуры для повышения продуктивности и качества урожая при заражении нематодой

Предпосадочная ДРОП-обработка клубней более чем в 2 раза повысила устойчивость растений к заражению нематодой: заражение контрольных растений, высаженных в поле со средним уровнем заражения почвы нематодой, составило 600 цист/раст., обработанных ДРОП – 263 цисты/раст., способствовала повышению накопления биомассы надземных и подземных органов на 15 и 20%, соответственно, а также привела к увеличению на 27% продуктивности (табл. 2), преимущественно за счет изменения фракционного состава клубней в сторону преобладания крупной и средней фракции (рис. 11).

Таблица 2

Влияние предпосадочной ДРОП-обработки клубней на продуктивность картофеля

Вариант	Число клубней с куста, шт.	Масса клубней с куста, г	Масса одного клубня, г
Контроль	11±1	293±32,4	26,6±2,3
ДРОП	10±1	400±34,2	36,2±5,4

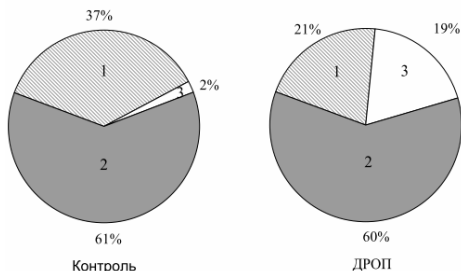


Рис. 11. Влияние предпосадочной ДРОП-обработки клубней картофеля на фракционный состав клубней картофеля

1 – мелкие клубни (<30 мм в диаметре), 2 – средние клубни, 3 – крупные клубни (>45 мм)

Одними из основных показателей качества клубней являются содержание крахмала и витамина С. Известно, что заражение нематодой вызывает снижение их содержания (Соловьева и др., 1987). В ходе нашего исследования было установлено, что предпосадочная обработка клубней картофеля кратковременными ежедневными снижениями температуры в

условиях зараженной нематодой почвы привела к увеличению содержания крахмала и витамина С в 1,4 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контрольными растениями.

Таким образом, предпосадочная обработка клубней кратковременными ежесуточными снижениями температуры при выращивании на зараженных нематодой почвах повышает продуктивность, улучшает качество урожая за счет увеличения содержания крахмала и витамина С в клубнях, обеспечивая, тем самым, поддержание на высоком уровне пищевой ценности картофеля для человека, и может быть рекомендована для выращивания картофеля на зараженных нематодой полях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения подвергаются комплексному действию факторов среды. Отсутствие у большинства из них способности к передвижению с целью избегания неблагоприятных воздействий внешней среды требует наличия адаптивных программ роста и развития в изменяющихся условиях произрастания. Большинство исследований до настоящего времени были сконцентрированы на изучении влияния на растения длительного действия низких температур (Александров, 1975; Удовенко, Гончарова, 1982; Кислюк, 1985; Титов, 1989; Кузнецов, 1992; Войников и др., 2004; Трунова, 2007; Guy, 1990; Thomashow, 1999; Waner, Junttila, 1999; Pienfield, 2005). Однако даже небольшие колебания температуры могут оказать существенное влияние на рост и развитие растений (Franklin, 2010; McClung, Davis, 2011). Так, перепад температуры всего в 4°C приводит к переключению циркадных часов у растений (Somers et al., 1998). Согласно прогнозам изменения климата суточные температурные флуктуации будут усиливаться (IPCC, 2007), особенно в ранневесенний период (Филатов и др., 2006). В связи с этим, особую важность приобретает проблема изучения не только влияния экстремальных температурных условий, вызывающих у растений повышение устойчивости, но и небольших колебаний суточной температуры.

Взаимовлиянию абиотических и биотических факторов в литературе уделяется много внимания. Абиотический стресс, например озон, усиливает устойчивость к заражению (Park et al., 2001). Однако в большинстве случаев длительное воздействие стрессового абиотического фактора, такого как засуха или нарушение минерального питания, приводит к ослаблению защиты и усиливает восприимчивость растений к патогенам (Grodzhi et al., 2009). Устойчивость к комбинациям различных стрессовых факторов является комплексным процессом, включающим множественные сигнальные пути (Mittler, 2006), и, в частности, одним из ключевых факторов среды, влияющим на активацию защитных путей у растений, является температура (Alcázar, Parker, 2011). Нами

установлено, что экспериментальные воздействия, включающие обработку кратковременными ежесуточными снижениями температуры (ДРОП), вызывают повышение устойчивости к заражению нематодой восприимчивого сорта картофеля. Это дает основание утверждать, что ДРОП-обработка выполняет роль прайминга для растений и делает их более устойчивыми к последующему заражению фитопаразитом. Мобилизацию защитных функций растительного организма, вызванную праймингом, часто связывают с выработкой у растений иммунитета или стресс-устойчивости (Congrath, 2011). И хотя данный феномен известен давно, молекулярные основы прайминга у растений изучены недостаточно. Нами впервые установлено, что ДРОП воздействия привели к экспрессии гена *H1* – одного из *R* генов, ответственных за развитие реакции сверхчувствительности и участвующих в повышении устойчивости к заражению нематодой. Согласно одной из гипотез о молекулярном механизме прайминга у растений, активацию защитных генов могут вызывать структурные изменения (ремоделирование) хроматина (Bruce et al., 2007). Так, недавно установлено, что замена гистона H2A на вариацию H2A.Z является важной в регуляции экспрессии защитных салицил-зависимых PR генов у арабидопсиса (March-Diaz et al., 2008). Структурные изменения в хроматине, по-видимому, служат своеобразной «памятью о прайминге» (van der Burg, Takken, 2009) и способствуют развитию системной устойчивости у растений (Jaskiewicz et al., 2011). Кроме того, именно ремоделирование хроматина, в частности, замена гистона H2A на вариацию H2A.Z, играет ключевую роль в восприятии растением температурных флуктуаций (Kumar, Wigge, 2010). Вышесказанное позволяет нам высказать предположение о том, что в качестве одного из возможных молекулярных механизмов, посредством которого сгенерированные температурными перепадами (ДРОП-обработкой) сигналы инициируют иммунные отклики у растений картофеля в ответ на заражение нематодой, может служить ремоделирование хроматина.

В целом, полученные в результате проведенного исследования экспериментальные данные позволили выявить общие закономерности в реакции ДРОП-обработанных растений на последующее заражение нематодой, тем самым, углубляя и расширяя знания о механизмах устойчивости растений к действию факторов разной природы.

ВЫВОДЫ

1. Кратковременные ежесуточные снижения температуры (ДРОП) способствуют уменьшению негативного влияния заражения на ростовые процессы и позволяют поддерживать соотношение массы надземных и подземных органов на уровне контроля.

2. Обработка растений кратковременными ежесуточными снижениями температуры снижает содержание хлорофиллов в период активного питания личинок нематоды, что обусловлено развитием защитных реакций в ответ на заражение.

3. В реакции фотосинтетического аппарата на заражение нематодой у растений картофеля, обработанных ДРОП, можно выделить два этапа: первый - до трех недель, когда отсутствуют видимые нарушения фотохимических реакций, что свидетельствует о поддержании растений в функционально активном состоянии, и второй - до полутора месяцев, когда эти нарушения выявляются.

4. ДРОП-обработка растений восприимчивого к заражению сорта увеличивает уровень ненасыщенных жирных кислот до уровня у устойчивого сорта, что обеспечивает повышение холодоустойчивости и подготавливает восприимчивые растения к последующему заражению нематодой, позволяя им распознавать внедрение паразита и развивать защитные реакции.

5. Кратковременные ежесуточные снижения температуры вызывают эффект кросс-адаптации, связанный с повышением холодоустойчивости растений и устойчивости к заражению нематодой. В основе этого явления лежит повышение экспрессии *SOR* гена *ci7* и *R* гена *H1* в листьях картофеля. Эффект снижения заражения нематодой отмечается только в случае, когда ДРОП-обработка предшествует заражению.

6. Предпосадочная ДРОП-обработка клубней картофеля при заражении нематодой почвы увеличивает продуктивность, улучшает качество урожая за счет увеличения содержания крахмала и витамина *C* в клубнях и может быть рекомендована при выращивании картофеля на зараженных нематодой полях.

7. Таким образом, ДРОП-обработка является для растений праймингом, способствующим повышению жизнеспособности растительного организма и активации защитных реакций в ответ на заражение нематодой, приводя к развитию системной устойчивости. Один из возможных молекулярных механизмов ДРОП воздействия на растения включает ремоделирование хроматина, которое приводит к активации генов устойчивости.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Сысоева М. И., Лаврова В. В., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В. Кросс-адаптация растений картофеля к действию низких температур и заражению картофельной цистообразующей нематодой // *Физиология растений*. Т. 58, № 6. 2011. С. 853–858.

2. **Лаврова В. В.**, Сысоева М. И., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В., Матвеева Е. М. Экспрессия гена *ci7* в листьях картофеля при действии кратковременных ежесуточных снижений температуры // *Труды КарНЦ РАН*. Серия «Экспериментальная биология». № 3. 2011. С. 73–77.

3. Matveeva E. M., Sysoeva M. I., **Lavrova V. V.**, Sherudilo E. G. Influence of infestation by potato cyst-forming nematode on photosynthetic apparatus of potato plants // *Russian Journal of Nematology*. № 17 (2). 2009. P. 156–157.

В прочих изданиях:

4. **Лаврова В. В.**, Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г., Сысоева М. И. Влияние предпосевной низкотемпературной обработки клубней на развитие растений картофеля в условиях здоровых и инфицированных почв // Тез. докл XV Школы «Актуальные проблемы биологии развития» (Звенигород, 19-24 октября 2008 г.). Звенигород, 2008. С. 55–57.

5. **Лаврова В. В.**, Сысоева М. И., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г. Влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры на состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля при заражении картофельной цистообразующей нематодой // Тез. докл. Междун. научн. конф. «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» (Апатиты, 7-11 июня 2009 г.). Апатиты: ООО «КазМ», 2009. С. 189–191.

6. **Лаврова В. В.** Состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля устойчивого и восприимчивого сортов к *Globodera rostochiensis* при действии ежесуточных кратковременных снижений температуры // Тез. докл. 13-й Междун. Пушинской школы-конференции «Биология – наука XXI века» (28 сентября-2 октября 2009 г., г. Пушино). Пушино, 2009. С. 234.

7. Matveeva E. M., Sysoeva M. I., **Lavrova V. V.**, Sherudilo E. G. Influence of infestation by potato cyst-forming nematode on photosynthetic apparatus of potato plants // Abstracts of International Symposium «Nematodes in Tropic Ecosystems» (Ha Noi, Vietnam, 17-21 August, 2009). Hanoi, 2009. P. 23.

8. Sysoeva M., Matveeva E., Sherudilo E., **Lavrova V.** Potato plant responses to temperature drop and phytonematode invasion // Abstracts of the 5th International conference «Plant and Microbe Adaptation to the Cold» (Aas, Norway, 4-8 December, 2009). Aas, 2009. P. 70.

9. Сысоева М. И., **Лаврова В. В.**, Марковская Е. Ф., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г. Влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры на состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля в условиях заражения картофельной цистообразующей нематодой // *Труды КарНЦ РАН*. Сер. Экспериментальная биология. № 2. 2010. С. 41–46.

10. Sherudilo E. G., Sysoeva M. I., Matveeva E. M., **Lavrova V. V.** Potato plant responses to the combination of temperature drop and phytonematode invasion // Abstracts of XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB) (Valencia, Spain, 4-9 July 2010). FESPB, 2010. P. 187–188.

11. **Lavrova V. V.**, Sysoeva M. I., Matveeva E. M., Sherudilo E. G. Effect of temperature drop on potato plant responses to biotrophic pathogen // Abstracts of SEB Annual Main Meeting (Prague, Czech Republic, 30 June – 3 July, 2010). 2010. P. 358–359.

12. **Лаврова В. В.**, Сысоева М. И., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В. Кросс-адаптация растений картофеля к действию кратковременных низкотемпературных обработок и заражению картофельной цистообразующей нематодой // Тез. докл. Всерос конф. «Растение и стресс». (Москва, 9-12 ноября 2010 г.). М., 2010. С. 213–214.

13. Матвеева Е. М., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г., **Лаврова В. В.** Реакция растений картофеля на кратковременные низкотемпературные воздействия при разных дозах заражения облигатным фитопаразитом // Нематоды естественных и трансформированных экосистем. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. С. 78–80.

14. **Лаврова В. В.**, Сысоева М. И., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В., Матвеева Е. М. Экспрессия гена *ci7* в листьях картофеля при кратковременных снижениях температуры // Матер. докл. Междунар. конф. «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 4-10 июля 2011 г.). Ч. 2. Нижний Новгород, 2011. С. 402–403.

15. **Lavrova V.**, Sysoeva M., Matveeva E., Sherudilo E., Topchieva L. Cross-adaptation of potato plants to temperature drop and nematode invasion // Abstracts of the 18th Triennial Conference of the European Association for Potato Research (Oulu, Finland, 24-29 July 2011). Helsinki, 2011. P. 141.

16. Matveeva E., Sysoeva M., Sherudilo E., **Lavrova V.** Temperature drop at early stages of ontogenesis as an effective tool to increase potato plant resistance to obligate parasite invasion // Abstracts of the 18th Triennial Conference of the European Association for Potato Research (Oulu, Finland, 24-29 July 2011). Helsinki, 2011. P. 145.

17. Sysoeva M., **Lavrova V.**, Matveeva E., Sherudilo E. The effects of pre-planting treatments of seed tubers by a temperature drop on the productivity and quality of potato // Abstracts of the 18th Triennial Conference of the European Association for Potato Research (Oulu, Finland, 24-29 July 2011). Helsinki, 2011. P. 139.

Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура «Times».
Уч.-изд. л. 1,1. Усл. печ. л.1,3. Подписано в печать 24.03.12.
Тираж 100 экз. Изд. № 282. Заказ № 36.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50