

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ СНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ЗАРАЖЕННОГО НЕМАТОДОЙ КАРТОФЕЛЯ

М. И. Сысоева, В. В. Лаврова, Е. М. Матвеева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние предобработки кратковременными ежесуточными снижениями температуры (ДРОП) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях зараженных нематодой растений картофеля. По содержанию каротиноидов различий между здоровыми и зараженными растениями не установлено. Заражение нематодой контрольных растений сопровождалось повышением содержания хлорофиллов в листьях, а ДРОП-обработка вызывала их снижение. Предполагается, что выявленные различия по содержанию хлорофиллов могут быть связаны с метаболическим статусом растения на момент заражения. По-видимому, ДРОП-обработка является для растения праймингом, способствующим формированию устойчивости к нематодe.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Solanum tuberosum* L., кратковременные ежесуточные снижения температуры, нематодоустойчивость, фотосинтетические пигменты, картофельная цистообразующая нематода.

M. I. Sysoeva, V. V. Lavrova, E. M. Matveeva. EFFECT OF DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROPS ON THE CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN THE LEAVES OF NEMATODE-INFECTED POTATO PLANTS

We studied the effect of pretreatment with daily short-term temperature drops (DROP) on the content of photosynthetic pigments in the leaves of nematode-infected potato plants. No differences between healthy and infected plants were found as regards carotenoid content. Infection with nematode resulted in a rise in chlorophyll content in the leaves of the control plants, whereas DROP treatment caused it to decrease. Presumably, the differences in the content of chlorophylls may be related to the metabolic status of the plants at the time of infestation. DROP treatment appears to be a priming promoting the plants' resistance to the nematode.

Key words: *Solanum tuberosum* L., daily short-term temperature drops, nematode resistance, photosynthetic pigments, potato cyst nematode.

Введение

Температура является одним из факторов, регулирующих иммунный ответ растения на заражение патогенами [Zhu et al., 2010; Iorizzo

et al., 2011]. Особый интерес представляют работы по изучению флуктуирующей суточной температуры, широко распространенной в природе, особенно в условиях Севера. Согласно одному из сценариев изменения клима-

та суточные перепады температур могут усиливаться [IPCC, 2007], особенно в ранневесенний период [Филатов и др., 2003]. В предыдущих исследованиях нами установлено, что предобработка растений картофеля кратковременными ежесуточными снижениями температуры (ДРОП; от англ. drop – «падение») вызывает эффект кросс-адаптации, повышая не только холодоустойчивость, но и устойчивость растения к широко распространенному и высоковредоносному паразиту – картофельной цистообразующей нематоде *Globodera rostochiensis* Woll. [Сысоева и др., 2011]. В основе этого явления лежит активация экспрессии гена холодоустойчивости *ci7* [Лаврова и др., 2011] и гена устойчивости к нематоды *H1* [Сысоева и др., 2011]. Кроме того, действие переменной суточной температуры способно вызывать увеличение содержания в листьях гексоза [Марковская и др., 2010], что в случае проникновения нематоды является метаболическим сигналом для индукции экспрессии защитных генов [Bolton, 2009].

Известно, что одним из первых действие стресс-факторов разной природы воспринимает фотосинтетический аппарат растения. Заражение растений нематодой сопровождается значительными изменениями состава пигментов и их количества [Васильева и др., 2009; Ahmed et al., 2009], причем степень изменений зависит от устойчивости растения и уровня заражения нематодой [Соловьева и др., 1980]. К настоящему времени изучено действие кратковременных ежесуточных снижений температуры на функциональное состояние фотосинтетического аппарата в условиях заражения [Сысоева и др., 2010]. В то же время влияние периодических снижений температуры на содержание фотосинтетических пигментов при заражении нематодой остается неисследованным, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Мини-клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L., с. Невский – восприимчивый к картофельной цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* Woll., патотип Ro1), полученные в ГНУ «Карельская ГСХОС Россельхозакадемии», проращивали на свету в течение трех недель, высаживали в пластиковые сосуды с песком при поливе питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 5,5–5,6) и выставляли в камеру искусственного климата при температуре 23 °С, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч и освещенности 10 клк. По достижении фазы трех листьев часть

растений оставляли при 23 °С (вариант контроль), а остальные подвергали в течение шести суток ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5 °С) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП). На следующий день после завершения температурных обработок часть растений каждого варианта заражали нематодой (10 цист/растение), а часть оставляли незараженными. Здоровые и зараженные растения каждого варианта выращивали 1,5 месяца в оптимальных для роста и развития условиях. Листья для анализа отбирали по завершении температурных обработок до заражения (0-е сутки) и после заражения (на 2, 20 и 45-е сутки).

Содержание пигментов (хлорофиллов, каротиноидов) определяли на спектрофотометре СФ-2000 («Спектр», Россия) в спиртовом экстракте при величине оптической плотности 665, 649, 440,5 нм [Бернштейн, Каминский, 1986; Мерзляк и др., 1996]. Концентрацию пигментов рассчитывали по стандартным уравнениям [Lichtenthaler, Wellburn, 1983].

Измерения проводили в четырех биологических повторностях. На рисунках приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные ошибки. Данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statgraphics for Windows 7.0. В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $P < 0,05$. Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИБ КарНЦ РАН.

Результаты

По завершении кратковременных низкотемпературных обработок перед заражением (0-е сутки) содержание фотосинтетических пигментов у растений, обработанных ДРОП, не отличалось от контроля (рис. 1, 2).

Заражение растений нематодой в период до 20-х суток сопровождалось повышением хлорофиллов на 10 %, в основном за счет увеличения содержания хлорофилла *a* (рис. 1). В дальнейшем, к 45-м суткам содержание пигментов снижалось и было сопоставимо с таковым у контрольных растений.

Иная реакция была получена для растений, обработанных ДРОП. К 20-м суткам заражения отмечено снижение содержания зеленых пигментов на 28 % по сравнению с исходным уровнем, причем уровень хлорофилла *a* снижался начиная уже со 2-х суток заражения. К концу эксперимента содержание фотосинтетических пигментов у зараженных и незараженных растений не отличалось от контроля (рис. 1).

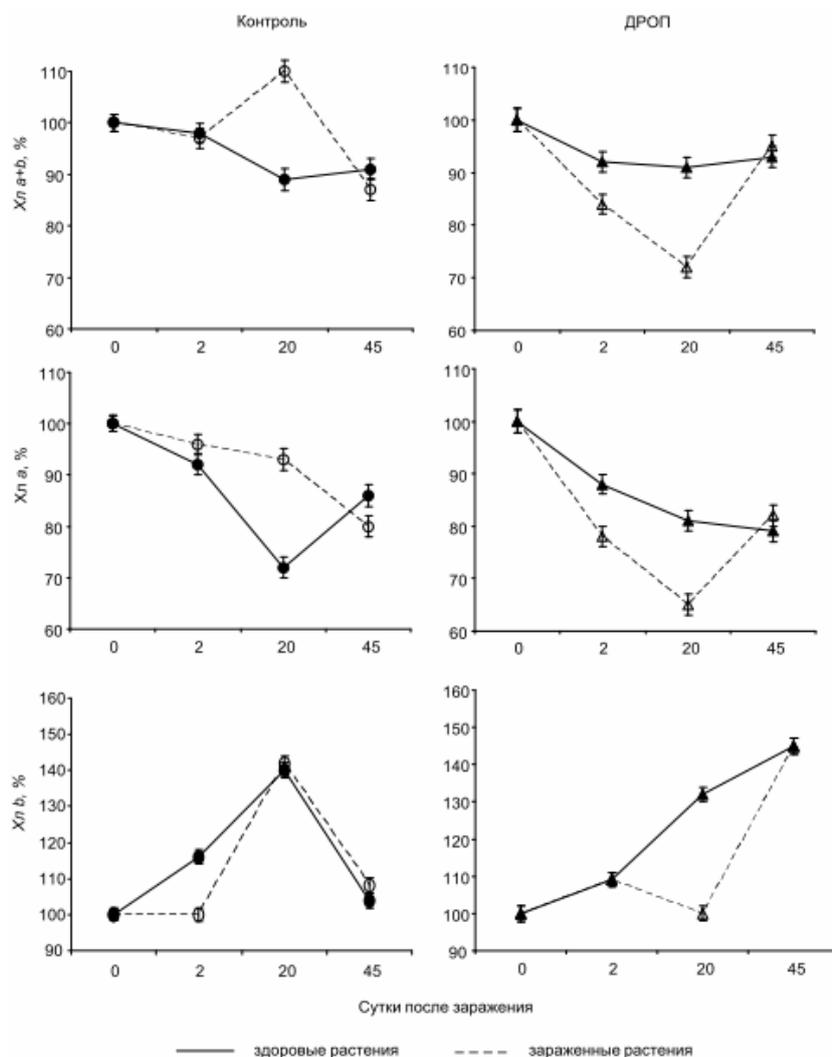


Рис. 1. Общее содержание хлорофиллов у контрольных и ДРОП-обработанных растений при заражении нематодой:

Хл a+b; 100 % = 9,9 мг/г сух. массы для контроля и 10,1 мг/г сух. массы для ДРОП; Хл a; 100 % = 7,4 мг/г сух. массы для контроля и 7,8 мг/г сух. массы для ДРОП; Хл b; 100 % = 2,5 мг/г сух. массы для контроля и 2,2 мг/г сух. массы для ДРОП

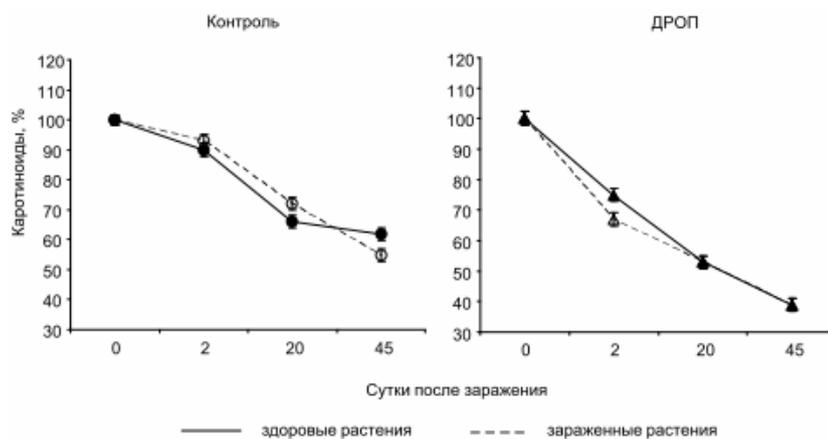


Рис. 2. Содержание каротиноидов у контрольных и ДРОП-обработанных растений при заражении нематодой:

100 % = 2,9 мг/г сух. массы для контроля и 3,6 мг/г сух. массы для ДРОП

Содержание каротиноидов снижалось на протяжении всего периода развития паразита, однако разницы между здоровыми и зараженными растениями не выявлено (рис. 2).

Обсуждение

Анализ полученных данных позволил установить разную реакцию пигментного аппарата зараженных растений картофеля в контроле и при ДРОП-обработке. Заражение контрольных растений сопровождалось повышением содержания хлорофиллов. В литературе имеются разные мнения, объясняющие этот факт. В частности, это может быть неспецифической реакцией растения в ответ на внедрение паразита. Личинки нематоды для активного роста и развития потребляют большое количество питательных веществ (углеводов), что по принципу обратной связи может стимулировать фотосинтетическую функцию, позволяя растениям обеспечить поддержание в норме своей жизнедеятельности, не снижая при этом продуктивности [Соловьева и др., 1980]. Увеличение содержания пигментов может быть и результатом стимулирующего действия самого паразита с целью формирования наиболее благоприятных условий для своего развития [Рубин и др., 1975]. Известно, что паразит изменяет метаболизм растения для получения доступа к питательным веществам [Goverse et al., 2000]. Однако такой эффект во многом зависит от уровня заражения. В наших экспериментах исходный уровень заражения соответствовал среднему, который, согласно литературным данным [Рийспере, Рийспере, 1973], способен вызвать стимуляцию фотосинтетических процессов. Обращает на себя внимание факт увеличения содержания хлорофиллов преимущественно за счет хлорофилла *a*, что согласуется с данными литературы об изменении в условиях биотического стресса содержания пигментов, и в первую очередь хлорофилла *a* [Ahmed et al., 2009]. Возможно, это связано с изменениями, происходящими в пигмент-белковых комплексах, в состав которых входят молекулы хлорофилла *a* [Shimada et al., 1990].

Предобработка растений кратковременными ежесуточными снижениями температуры вызвала снижение содержания хлорофиллов в период заражения вплоть до 20-х суток инфицирования. Подобная закономерность была отмечена и при изучении фотохимической активности фотосинтетического аппарата при заражении нематодой [Сысоева и др., 2010]. Вероятно, это связано с тем, что именно в данный период паразит характеризуется метаболической зависи-

мостью от растения-хозяина и оказывает наибольшее влияние на его физиологические процессы, включая развитие защитных реакций [Матвеева и др., 1997]. Основываясь на ранее проведенных исследованиях, показывающих повышение устойчивости картофеля к нематоде под действием ДРОП [Сысоева и др., 2011], можно предположить, что такая реакция связана с развитием защитных механизмов. В частности, в ответ на действие кратковременных ежесуточных снижений температуры происходит повышение содержания гексоз (глюкозы, фруктозы), обуславливая тем самым высокий метаболический статус растения [Марковская и др., 2010]. Согласно ряду исследований [Herbers et al., 1996; Essman et al., 2008; Rodaki et al., 2009], углеводный статус играет важную роль в развитии устойчивости растений к патогенам. У устойчивых растений при инвазии повышается содержание гексоз, которые, в свою очередь, оказывают влияние на активность генов, ответственных за биосинтез [Bilgin et al., 2010] или деградацию пигментов [Kariola et al., 2005], что может приводить к снижению их содержания. Таким образом, наблюдаемое снижение содержания фотосинтетических пигментов у ДРОП-обработанных растений при заражении можно связать с их высоким метаболическим статусом еще до момента внедрения паразита. Превалирование гексоз у ДРОП-растений может являться метаболическим сигналом для индукции экспрессии защитных генов, в частности, PR генов [Bolton, 2009]. Кроме того, известно, что при заражении гексозы транспортируются в клетку, снижая тем самым концентрацию углеводов в апопласте и ограничивая паразита в количестве потребляемых веществ, необходимых для его роста и развития. Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями, показывающими, что ДРОП-обработка снижает уровень заражения, способствуя большей жизнеспособности растения и угнетению паразита [Сысоева и др., 2011], поскольку известно, что условия размножения нематод ухудшаются при высокой интенсивности метаболизма растений [Рийспере, Рийспере, 1973].

В нашем исследовании различий в содержании общего пула каротиноидов между здоровыми и зараженными растениями как в контроле, так и в варианте ДРОП не обнаружено. Однако известно, что по изменению содержания различных представителей каротиноидов можно судить об окислительных процессах, происходящих в зараженных тканях растений [Васильева и др., 2009]. В работах, посвященных изучению состава фотосинтетических пигментов растений, инвазированных фитонематодой [Со-

ловьева и др., 1980; Васильева и др., 2009], было показано увеличение содержания неоксантина в общем пуле виоло-ксантинового цикла, свидетельствующее об усилении окислительных процессов под влиянием паразита. В связи с этим особый интерес для будущих исследований представляет изучение фракционного состава желтых пигментов у ДРОП-обработанных растений при заражении. Можно предположить, что переменные температуры изменяют метаболизм каротиноидов в сторону образования ксантофиллов, играющих важную роль в защите фотосинтетического аппарата от окислительных повреждений, вызванных заражением.

Таким образом, проведенное исследование показало различия в реакции пигментного аппарата контрольных и ДРОП-обработанных растений картофеля при заражении нематодой. Высокий метаболический статус ДРОП-обработанных растений способствовал снижению содержания хлорофиллов при заражении и развитию защитных механизмов. Это дает основание предполагать, что кратковременные снижения температуры являются для растения праймингом, обеспечивающим их подготовку к последующим стрессовым условиям, вызванным заражением нематодой.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 10-04-00097_а), Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8050) и Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России» (№ г. р. 01201262103).

Литература

- Бернштейн И. Я., Камминский Ю. Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии // Л.: Химия, 1986. 199 с.
- Васильева И. С., Удалова Ж. В., Зиновьева С. В., Пасешниченко В. А. Стероидные фураностаноловые гликозиды – новый класс природных адаптогенов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, № 5. С. 517–526.
- Лаврова В. В., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В., Матвеева Е. М. Экспрессия гена *ci7* в листьях картофеля при действии кратковременных ежедневных снижений температуры // Труды КарНЦ РАН. Сер. «Экспериментальная биология». 2011. № 3. С. 73–77.
- Марковская Е. Ф., Шерудило Е. Г., Галибина Н. А., Сысоева М. И. Роль углеводов в реакции теплолюбивых растений на кратковременные и длительные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 687–694.
- Матвеева Е. М., Груздева Л. И., Евстратова Л. П. Влияние патогенов на ростовые процессы картофеля // Вестник РАСХН. 1997. № 4. С. 29–32.
- Мерзляк М. Н., Чивкунова О. Р., Лехимена Л., Белевич Н. П. Ограничения и дополнительные возможности спектрофотометрического анализа пигментов в экстрактах листьев высших растений // Физиология растений. 1996. Т. 43, № 6. С. 926–936.
- Рийспере У. Р., Рийспере А. Ю. О влиянии некоторых экзогенных факторов на развитие и формирование соотношения полов у картофельной нематоды // Борьба с картофельной нематодой: материалы симпозиума, Тарту. 1973. С. 67–70.
- Рубин А. Б., Арциховская Е. В., Аксенова В. А. Биохимия и физиология иммунитета растений. Высш. школа. 1975. 320 с.
- Соловьева Г. И., Потаевич Е. В., Кучко Л. А., Васильева А. П. Цистообразующая картофельная нематода и меры борьбы с ней. Петрозаводск: Карелия. 1980. 24 с.
- Сысоева М. И., Лаврова В. В., Марковская Е. Ф., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г. Влияние ежедневных кратковременных снижений температуры на состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля в условиях заражения фитопаразитической нематодой // Труды КарНЦ РАН. Сер. «Экспериментальная биология». 2010. № 2. С. 41–46.
- 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. 2011. Т. 58, № 6. С. 853–858.
- Филатов Н. Н., Назарова Л. Е., Сало Ю. А., Семенов А. В. Динамика и прогноз изменения климата Восточной Финноскандии // Гидроэкологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2003. С. 33–39.
- Ahmed N., Abbasi M. W., Shaukat S. S., Zaki M. J. Physiological changes in leaves of mungbean plants infected with *Meloidogyne javanica* // Phytopathol. Mediterr. 2009. Vol. 48. P. 262–268.
- Bilgin D. D., Zavala J. A., Zhu J., Clough S. J., Ort D. R., DeLucia E. H. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes // Plant, cell and environment. 2010. Vol. 33. P. 1597–1613.
- Bolton M. D. Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire // MPMI. 2009. Vol. 22. N 5. P. 487–497.
- Essmann J., Bones P., Weis E., Scharte J. Leaf carbohydrate metabolism during defense // Plant Signaling & Behavior. 2008. Vol. 3, N 10. P. 885–887.
- Iorizzo M., Mollov D. S., Carputo D., Bradeen J. M. Disease resistance gene transcription in transgenic potato is unaltered by temperature extremes and plant physiological age // Eur. J. Plant Pathol. 2011. Vol. 130. P. 469–476.
- IPCC (2007). Climate Change 2007: Climate Change Impacts, Adaptation and Vulnerability. Fourth Assessment Report, Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Goverse A., Overmars H., Engelbertink J., Schots A., Bakker J., Helder J. Both Induction and Morphogenesis of Cyst Nematode Feeding Cells Are Mediated by Auxin // MPMI. 2000. Vol. 13, N 10. P. 1121–1129.

Herbers K., Meuwly P., Frommer W. B., Metraux J., Sonnewald U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway // *Plant Cell*. 1996. Vol. 8. P. 793–803.

Kariola T., Brader G., Li J., Palva T. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, effects the balance between defense pathways in plants // *Plant Cell*. 2005. Vol. 17. P. 282–294.

Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // *Biochemical Society Transactions*. 1983. Vol. 11. P. 591–592.

Rodaki A., Bohovych I. M., Enjalbert B., Young T., Odds F. C., Gow N. A. R., Brown A. J. P. Glucose Promotes Stress Resistance in the Fungal Pathogen *Candida albicans* // *Molecular Biology of the Cell*. 2009. Vol. 20. P. 4845–4855.

Shimada Y., Tanaka A., Tanaka Y., Takabe T., Takabe T., Tsuji H. Formation of chlorophyll-protein complexes during greening 1. Distribution of newly synthesized chlorophyll // *Plant Cell Physiol*. 1990. Vol. 31, N 5. P. 639–647.

Zhu Y., Qian W., Hua J. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR-proteins // *PLoS Pathog*. 2010. Vol. 6. P. 1–12.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сысоева Марина Ивановна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sysoeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Лаврова Виктория Витальевна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: VVLavrova@mail.ru
тел.: (8142) 762706

Матвеева Елизавета Михайловна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Sysoeva, Marina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: sysoeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Lavrova, Victoria

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: VVLavrova@mail.ru
tel.: (8142) 762706

Matveeva, Elizaveta

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: matveeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706