

УДК 632.656:581.1

**ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ  
И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В РАСТЕНИЯХ ТОМАТОВ  
ПРИ ИНВАЗИИ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДОЙ *Meloidogyne incognita*  
(KOFOID ET WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949**

**Ж. В. Удалова\*, С. В. Зиновьева\*\***

Представлено академиком РАН Д.С. Павловым 02.07.2019 г.

Поступило 03.07.2019 г.

Проведено исследование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности фермента пероксидазы, а также фотосинтетических пигментов в восприимчивых растениях томатов, обработанных салициловой кислотой (СК), при заражении галловой нематодой *Meloidogyne incognita*. Показано, что в корнях СК-обработанных растений активность ПОЛ выше по сравнению с необработанными, особенно в случае инвазии нематодами. Достоверное увеличение активности ПОЛ в СК-обработанных инвазированных растениях по сравнению с необработанными отмечалось в период перехода личинок в седентарную стадию и начала образования мест питания – гигантских клеток (3–5 сутки, после инвазии). Это, по-видимому, способствует угнетению развития паразита и снижению зараженности растений, а также указывает на участие окислительных процессов в механизме индуцированной устойчивости растений к галловым нематодам. В СК-обработанных растениях качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов, нарушенный инвазией, восстанавливался и соответствовал контрольному уровню.

*Ключевые слова:* паразиты растений, галловые нематоды, перекисное окисление липидов, пероксидаза, фотосинтетические пигменты.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524886677-681>

Галловые нематоды р. *Meloidogyne* – опасные биотрофные паразиты корневой системы, поражающие более 2000 видов растений, включая многие экономически важные культуры [1]. Их действие на растения складывается из механического повреждения, химического воздействия и использования клеточного содержимого в качестве пищевых ресурсов. Реакция растений на этих паразитов тесно связана с физиологическими и анатомическими особенностями нематод (наличие пищеводных желез, секреты которых выделяются в растительную ткань через стилет), а также со своеобразием жизненного цикла. Инвазионные личинки (J2) проникают с помощью стилета в зону удлинения корня, достигают сосудистого цилиндра, где локализуются и становятся неподвижными и благодаря секреторной деятельности желез создают зону питания – гигантские клетки, структура которых формируются в процессе гипертрофии и аномалий клеточного деления. Клетки растений, окружающие зоны питания нематод, делятся и разбухают, вызывая образование галлов. Во время подвижной стадии, с момента вторжения

галловой нематоды в корни до локализации в зоне сосудистого цилиндра, они наносят лишь незначительные повреждения, так как мигрируют между клетками.

Наиболее ранняя ответная реакция растений на инвазию нематодами – интенсивное образование активных форм кислорода (АФК). При этом отмечено, что в растениях томатов, обладающих геном устойчивости *Mi1,2*, ответ которых на заражение связан с реакцией сверхчувствительности, уровень образования АФК заметно выше по сравнению с восприимчивыми сортами растений [2, 3]. Активные формы кислорода могут инициировать окислительный стресс, сопровождаемый повреждениями компонентов клеточных мембран, в первую очередь липидов, активизируя процессы их перекисного окисления (ПОЛ), приводящего к гибели клеток. Активные формы кислорода могут также выступать в качестве сигнальных молекул, индуцирующих ряд молекулярных, биохимических и физиологических реакций, которые способствуют формированию адаптивных механизмов и повышению устойчивости растений. В поддержание уровня липопероксидации и регуляции АФК в безопасных для клетки концентрациях принимает участие природная антиоксидантная система, представленная низко- и высокомолекулярными соединениями, такими как супе-

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова  
Российской Академии наук, Москва*

\*E-mail: [udalova.zh@rambler.ru](mailto:udalova.zh@rambler.ru)

\*\*E-mail: [zinovievas@mail.ru](mailto:zinovievas@mail.ru)

роксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, а также низкомолекулярные антиоксиданты — аскорбиновая кислота, глутатион, токоферолы, каротиноиды, антоцианы.

Кроме прямого действия на физиолого-биохимические процессы в клетке, АФК оказывают повреждающее влияние косвенного характера, проявляющееся в снижении содержания основных пигментов фотосинтеза [4].

Наиболее интенсивным индуктором образования АФК в клетке служит салициловая кислота (СК) [5]. Полагают, что важной функцией эндогенной СК является модификация эффектов АФК, что связано с её разнонаправленным влиянием на ключевые про- и антиоксидантные ферменты [6]. При действии СК в клетках инициируются процессы ПОЛ, что приводит к нарушению в работе фотосинтетических электронно-транспортных цепей и изменению содержания хлорофиллов и каротиноидов в хлоропластах растений [7, 8].

В настоящее время внимание исследователей к СК связано с обнаружением её ключевой роли в индукции системной приобретённой устойчивости растений к инфицированию фитопатогенами. Ранее проведённые нами исследования показали, что экзогенная обработка растений СК индуцирует устойчивость растений томатов к заражению галловой нематодой *M. incognita* [9]. К настоящему времени исследованы некоторые физиологические и молекулярно-генетические механизмы, происходящие в растениях при действии СК. Однако вопрос об окислительном стрессе у растений при инвазии их нематодами и изменении процессов фотосинтеза в случае индуцированной СК устойчивости к нематодам оставался открытым. Кроме того, для понимания участия антиоксидантной системы растений в процессе становления взаимоотношений растений и нематод необходимы исследования на протяжении всего жизненного цикла с момента вторжения нематод в растение до половозрелой стадии, которые до настоящего времени не проводились.

Цель работы — изучение процессов ПОЛ и антиоксидантной системы защиты клеток, а также состава фотосинтетических пигментов в растениях томатов *Lycopersicon esculentum* Mill при инвазии их галловой нематодой *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949 и действии СК на исследуемые процессы на протяжении развития нематод в корнях растений.

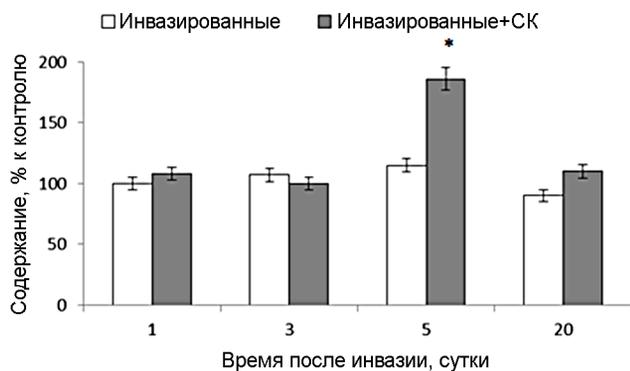
Исследования проводили на восприимчивом к нематоды гибриде томатов F<sub>1</sub> Гамаюн (индекс устойчивости 30%). Через три недели после прорастания

часть растений инвазировали нематодой — 3000 личинок на растение. Контролем были здоровые растения. Опыты проводили в 10-кратной повторности. Растительные пробы для анализов отбирали в определённые периоды после инвазии на ключевых этапах жизнедеятельности нематоды (3-и сутки — массовое внедрение личинок в корни, 5-е сутки — формирование места питания — гигантских клеток, 20-е сутки — завершение активного питания и формирование половозрелых особей).

Об уровне ПОЛ судили по накоплению продукта конечного продукта — малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [10]. Один из основных факторов снижения негативных воздействий АФК на клеточные структуры — активация пероксидазных реакций. Активность пероксидазы (ПО, КФ.1.11.1.7) измеряли спектрофотометрически, активность фермента выражали в условных единицах на 1 мг белка, содержание которого определяли по методу Бредфорда [10]. Количество хлорофиллов и каротиноидов оценивали по спектрам поглощения этанольных экстрактов листьев спектрофотометрически, как описано в работе [11]. Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики.

Приведённые на графике (рис. 1) данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии нематодной инвазии на ПОЛ в корнях в первые дни после инвазии. Некоторое снижение уровня МДА в корнях инвазированных растений было отмечено на 3-и сутки после инвазии (на 12%) — в период внедрения в корни. К 20-м суткам, к моменту завершения активного питания и формирования половозрелых самок, количество МДА было на 10% меньше, чем в здоровых растениях. В настоящее время в литературе активно обсуждается вопрос о влиянии самих нематод на модуляцию окислительных процессов, возникающих в тканях растений при инвазии. Имеются данные о выделении антиоксидантных ферментов личинками нематод в апопласт растений [3, 12]. Это, возможно, и явилось причиной снижения уровня ПОЛ в инвазированных растениях по сравнению с контролем в период продвижения личинок нематод по корню.

Инвазия СК-обработанных растений существенно повышала активность ПОЛ, особенно период максимальной активности паразита, связанный с проникновением в корни, формированием зоны питания и окончательного перехода паразита из мигрирующей стадии (личинки 2-го возраста) к седентарным (период с 3-х по 5-е сутки), и была достоверно выше, чем в контрольных растениях (рис. 1).

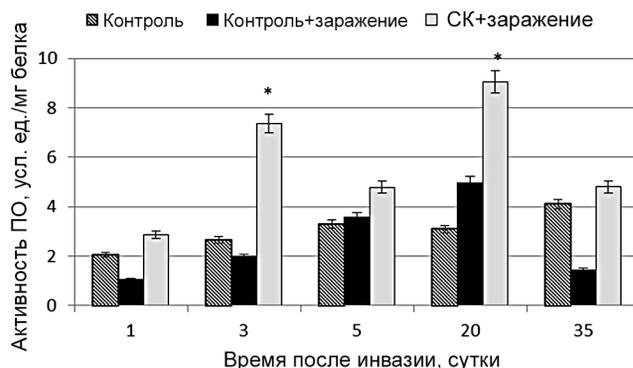


**Рис. 1.** Содержание МДА в корнях контрольных и СК-обработанных растений томатов при заражении *M. incognita* (% относительно неинвазированного контроля);  $n = 10$ , \* статистически достоверное отличие от контроля ( $P \leq 0,05$ ).

Исследование активности ПО показало, что инвазия не вызывает в начальный период заражения изменений в активности ПО: она оставалась на уровне контроля. Достоверное увеличение активности фермента при инвазии отмечено лишь на 20-е сутки после заражения (рис. 2). По-видимому, это и определило снижение уровня МДА в этот период.

Иная ситуация отмечена для СК-обработанных растений. Наши исследования показали, что характер изменений ферментативной активности, направленной на регуляцию действия свободных радикалов, зависел от стадии развития нематоды. В корнях СК-обработанных растений при их заражении наблюдается первоначальное повышение активности ПО относительно контроля к 3-м суткам с последующим ингибированием активности к 5-м суткам (рис. 2). В период массового проникновения личинок (3-е сутки) в корнях растений отмечено повышение активности пероксидазы на фоне значительного уровня накопления МДА. Такая реакция может быть связана с неспецифичностью ответной реакции на образование АФК, вызванное деятельностью нематоды. На этапе, когда личинки достигают проводящей системы растения и начинают формировать гигантские клетки (5-е сутки), в корнях СК-обработанных растений происходит снижение активности пероксидазы.

Это приводит к накоплению АФК, и, как следствие, индукции ими перекисного окисления липидов, что ведёт к накоплению МДА, токсичных соединений, ингибирующих развитие гигантских клеток в области внедрившихся личинок, ограничивая тем самым питание и развитие нематоды. Второй пик повышенной активности ферментов зафиксирован на 20-е сутки заражения. На поздних этапах паразитирования нематоды в СК-обработанных



**Рис. 2.** Активность пероксидазы (ПО) в корнях контрольных и СК-обработанных растений томатов при заражении *M. incognita*.  $M \pm m$ ,  $n = 10$ , \* статистически достоверное отличие от контроля ( $P \leq 0,05$ ).

растениях характеризуется повышенной активностью ферментов, позволяющая поддерживать баланс между образованием и обезвреживанием АФК, что имеет решающее значение в защите растительных тканей от окислительных процессов, вызванных жизнедеятельностью личинок при паразитировании. Следует отметить, что установленная динамика активности пероксидазы в корнях СК-обработанных растений при заражении имеет сходство с изменениями ферментативной активности у устойчивых растений [13].

Таким образом, согласно полученным результатам, восприимчивые растения на протяжении всего периода развития нематод в корнях имеют невысокий уровень активности ПОЛ и низкую активность ПО. Это позволяет личинкам нематод развиваться в благоприятных условиях. Повышенная активность ПО обнаруживалась лишь на 20-е сутки, которая, по-видимому уже не могла оказать ингибирующее влияние на нематод, которые к этому времени были уже сформированы во взрослых самок, находящиеся в галлах. Восприимчивые растения на ранних этапах становления паразито-хозяйинных отношений не способны в полной мере активировать защиту организма в ответ на заражение, и в корнях складываются благоприятные условия для формирования личинками модифицированных гигантских клеток, их активного питания и возможности успешного прохождения паразитом стадий жизненного цикла.

Одной из реакций растений на стресс является изменение содержания пигментов фотосинтеза [14]. Результаты проведенных исследований показали, что содержание фотосинтетических пигментов в инвазированных растениях начиная с момента проникновения в корень (3-е сутки) и далее за время наблюдений было ниже в сравнении со здоровыми,

**Таблица 1.** Содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях томатов при действии СК и инвазии *M.incognita*

Дни после инвазии	Вариант	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car <i>c</i>	Chl ( <i>a</i> + <i>b</i> ) + <i>c</i>
1	К	<b>1,32±0,34</b>	<b>0,48±0,11</b>	<b>0,27±0,03</b>	<b>2,16±0,21</b>
	И	1,39±0,29	0,51±0,09	0,28±0,02	1,93±0,35
	И+СК	1,39±0,38	0,59±0,19*	0,34±0,02	2,33±0,39
3	К	<b>1,58±0,24</b>	<b>0,65±0,18</b>	<b>0,35±0,03</b>	<b>2,58±0,42</b>
	И	1,32±0,34*	0,60±0,12	0,29±0,09*	2,22±0,35*
	И+СК	1,59±0,27	0,64±0,18	0,34±0,05	2,57±0,49
5	К	<b>1,69±0,21</b>	<b>0,60±0,23</b>	<b>0,41±0,06</b>	<b>2,71±0,55</b>
	И	1,39±0,26*	0,56±0,13	0,33±0,04*	2,28±0,46*
	И+СК	1,75±0,27	0,9±0,14	0,42±0,05	2,78±0,57
20	К	<b>1,1±0,31</b>	<b>0,68±0,21</b>	<b>0,56±0,17</b>	<b>2,34±0,55</b>
	И	0,87±0,25*	0,65±0,19	0,47±0,13*	2,00±0,51*
	И+СК	1,01±0,27	0,69±0,16	0,58±0,16	2,28±0,59

К – контроль, здоровые растения; И – инвазированные растения; И+СК – инвазированные растения, обработанные СК.

Результаты представлены в виде средней ± стандартная ошибка средней ( $n = 10$ );

\* – достоверные различия относительно К при  $P < 0,05$ .

особенно хлорофилла *a* (Chl *a*) (на 10–20%) и каротиноидов (Car) (16–20%), табл. 1.

Каротиноиды входят в антиоксидантную систему защиты растения. Помимо структурной и светозащитной функций, каротиноиды могут “тушить” активные формы кислорода. Наблюдаемое снижение уровня Car в инвазированных растениях по сравнению с контрольными указывает на снижение защиты фотосинтетического аппарата от действия окислительного стресса при нематодной инвазии. Особенно заметное снижение уровня фотосинтетических пигментов в растениях отмечено в период образования гигантских клеток и питания нематод (5–20-е сутки). В это время сумма всех пигментов в инвазированных растениях была ниже, чем в контроле, при этом количество Chl *a* на 20-й день после инвазии было на 20% ниже, что, по-видимому, связано с оттоком метаболитов в корни – зону питания нематод. Обработка заражённых растений томатов СК приводит к стабилизации фотосинтетического аппарата: содержание пигментов оставалось на уровне здоровых растений на протяжении всего опыта (табл. 1).

Очевидно, что в СК-обработанных растениях происходит увеличение образования каротиноидов – соединений, защищающих клетки от окислительного стресса, инициированного галловыми нематодами.

Полученные данные дополняют результаты ранее проведённых исследований. Нами было показано, что СК-обработка растений индуцирует их устойчивость к заражению нематодой, модулируя физиологический и иммунный статус подобно устойчивым растениям. Так, СК-обработанные

восприимчивые растения томатов при заражении обладают повышенной транскрипционной активностью гена устойчивости *Mi1*, *2* и ряда *PR*-генов (*PR1*, *PR6*) [15], что позволяет поддерживать в норме основные физиологические показатели растений (фотосинтез, формирование вегетативной массы, продуктивность).

Таким образом, физиолого-биохимические и молекулярно-генетические реакции в сочетании с полученными данными о динамике активности окислительных процессов в корнях растений при инвазии свидетельствуют о способности СК-обработанных растений к своевременному межклеточному распознаванию эффекторов личинок нематоды при заражении, передаче сигнала на геном и своевременной активации токсичных продуктов ПОЛ, оказывающих влияние на процессы проникновения и развития личинок.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Decraemer W., Hunt D.J.* Structure and classification in Plant nematology. 2nd Ed. Perry R.N., Moens M., ed. (Wallingford; Oxfordshire: CAB International). 2013. P. 3–29.
2. *Melillo M.T., Leonetti P., Bongiovanni M., et al.* //New Phytologist. 2006. V. 170. P. 501–512. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01724.x
3. *Melillo M.T., Leonetti P., Leone A., et al.* // Europ. J. Plant Pathol. 2011. V. 130. P.489–502. DOI: 10.1007/s10658-011-9768-4
4. *Козел Н.В. Шальго Н.В.* //Физиология растений. 2009. Т. 56. № 3. С. 351–358.

5. Desikan R., Soheila A.-H.-Mackerness, Hancock J.T., Steven J. // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. P. 159–172. DOI: 10.1104/pp.127.1.159
6. Herrera-Vásquez A., Salinas P., Holuigue L. // *Front Plant. Sci.* 2015. Mar. 19; 6:171. DOI: 10.3389/fpls.2015.00171
7. Zurbriggen M.D., Carrillo N., Hajirezaei M.-R. // *Plant Signal Behav.* 2010. V. 5. P. 393–396. DOI: 10.4161/psb.5.4.10793/
8. Nazar R., Iqbal N., Syeed S., et al. // *J. Plant. Physiol.* 2011. V. 168. P. 807–815. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.11.001
9. Зиновьева С.В., Удалова Ж.В., Васюкова Н.И. и др. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2011. № 5. С. 532–538.
10. Кузнецов Вл.В., Кузнецов В.В., Романов Г.А. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2012. 487 с.
11. Lichtenthaler H.K. // *Methods Enzymol.* 1987. V. 148. P. 350–382. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](http://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
12. Gillet F.X., Bournaud C., Antonino de Souza Júnior J.D., et al. // *Ann Bot.* 2017. 119(5)/ P. 775–789. DOI: 10.1093/aob/mcw260
13. Zacheo G., Blevé-Zacheo T., Pricolo G. // *Nematol. mediterr.* 1987. V. 15. P. 293–302.
14. Wada M. // *Plant Science.* 2013. V. 210. P. 177–182. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.05.016 7
15. Лаврова В.В., Зиновьева С.В., Удалова Ж.В. и др. // *ДАН.* 2016. Т. 476(4). P. 466–470.

**EFFECT OF SALICYLIC ACID ON THE OXIDATIVE AND PHOTOSYNTHETIC PROCESSES IN PLANTS TOMATOES BY INVASION WITH ROOT-KNOT NEMATODE *Meloidogyne Incognita* (KOFOID ET WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949**

**Zh. V. Udalova, S. V. Zinovieva**

*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS D.S. Pavlov July 2, 2019

Received July 3, 2019

A study of the processes of lipid peroxidation and the activity of the peroxidase enzyme, as well as photosynthetic pigments in susceptible tomato plants treated with salicylic acid (SA), during infection with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. It was shown that in the roots of SA-treated plants, the activity of lipid peroxidation is higher compared to untreated ones, especially in the case of nematode invasion. A significant increase in the activity of lipid peroxidation in SA-treated invasive plants compared with untreated was noted during the transition of larvae to the sedentary stage and the beginning of the formation of feeding places – giant cells (3–5 days after invasion). This, apparently, contributes to the inhibition of the development of the parasite and the reduction of plant infection, and also indicates the involvement of oxidative processes in the mechanism of the induced resistance of plants to root-knot nematodes. In the SA-treated plants, the qualitative and quantitative composition of photosynthetic pigments, disturbed by invasion, was restored and corresponded to the control level.

*Keywords:* parasites of plants, root-knot nematode, lipid peroxidation, peroxidase, photosynthetic pigments.