# РОЛЬ СТРЕССОВЫХ ФИТОГОРМОНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЯ НА ПРОНИКНОВЕНИЕ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД

***Удалова Ж.В., Зиновьева С.В.***
ФГБНУ «Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К.И.Скрябина»,
Центр паразитологии ИПЭЭ РАН

Введение. Галловые нематоды, являясь седентарными эндопаразитами растений, обладают развитой ферментативной системой. Она позволяет им проникнуть в растение, и начать питаться. В составе своего деградома *Meloidogyne incognita* имеет более 300 протеиназ [3]. Наиболее представительными классами являются цистеиновые и сериновые протеиназы. Растения, со своей стороны, активно обороняются, подключая различные системы регуляции. Гормональная регуляция в растении является важнейшим физиологическим процессом при стрессе. Известно, что под влиянием стрессоров снижается уровень гормонов-стимуляторов и увеличивается уровень гормонов-ингибиторов. При заражении растений различными патогенными организмами наблюдается быстрая активация стрессовых гормонов, которые индуцируют образование большого числа защитных белков в клетках растения, а также происходит интенсивное накопление целого ряда патогениндуцитруемых белков (PR-белков), к числу которых относятся ингибиторы протеиназ (ИП).

Одними из наиболее интересных и исследованных стрессовых гормонов являются жасмоновая и салициловая кислоты (ЖК и СК). Оба гормона относятся к ингибиторам роста. ЖК контролирует устойчивость растений к патогенам и насекомым-фитофагам, к поранению и элиситорам и др. [2]. В условиях биотического стресса жасмонаты индуцируют экспрессию генов, кодирующих ИП и разнообразных вторичных соединений. Синтезируются они в разных тканях растений в результате перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот. Этот процесс начинается в хлоропластах и заканчивается в пероксисомах. Концентрация жасмонатов в тканях растений в условиях стресса может повышаться в 100 тыс. раз.

СК относится к фитогормонам, которые обеспечивают растению устойчивость к повреждению различными патогенами. Она играет ключевую роль в формировании иммунного ответа, в том числе в реакции гиперчувствительности. Основной путь её синтеза проходит по фенилпропаноидному пути. Накопление СК в ответ на стрессовое воздействие обильное и быстрое. Содержание СК существенно различается не только в зависимости от родовой и видовой принадлежности растений, но значительно зависит от сорта. В томатах устойчивых к галловой нематоде уровень СК превышал таковой в восприимчивом сорте. Так концентрация СК в корнях томатов в 5-10 раз превышает содержание в листьях [4].

Стрессовые фитогормоны могут, как усиливать, так и тормозить действие друг друга. В ряде исследований было показано, что салицилат подавляет синтез жасмонатов [2]. В нашей работе было показано, что в системе томаты-галловая нематода конфликт между сигнальными путями, в которых задействованы ЖК и СК, отсутствовал [1]. Представляло интерес проанализировать активность ИП, которая является маркером системной индуцированнолй устойчивости (СИУ) в различных органах растения в зависимости от обработки ЖК и СК, поскольку данные гормоны экспрессируют каждый свой сигнальный путь.

Материалы и методы. Исследования проводили в системе томаты – галловая нематода *M. incognita*. Семена восприимчивого к нематоде гибрида томата $F_1$ Гамаюн, замачивали в водных растворах ЖК в концентрации $5x10^{-8}$ М; СК - $5x10^{-8}$ М; ЖК+СК - $5x10^{-8}$ М. Контроль – вода, время экспозиции – 2 часа, повторность – 20 растений. Семена были высажены в почву, через 30 дн. растения были пикированы, обработаны опрыскиванием теми же растворами растительных гормонов и заражены ~3 тыс., личинок *M. incognita*. Через 15 дней после заражения были взяты листья для анализа на активность ингибиторов протеиназ (ИП). Анализ антитрипсиновой активности проводили в листьях и корнях здоровых и инфицированных растений. Для этого последние были подвергнуты обработке жидким азотом и гомогенизированы. Белки экстрагировали 0,2 М фосфатным буфером pH 7.0, с последующим центрифугированием при 10 000 об/мин. Для дальнейших исследований использовали надосадочную жидкость. Способность полученных экстрактов подавлять активность трипсина оценивали путем определения амидазной активности данного фермента, используя в качестве субстрата бензоил-аргинин-пара-нитроанилид (БАПА). Активность ингибиторов, выражали в ингибиторных единицах (и.ед.), за единицу которой принимали такое количество белка-ингибитора, которое вызывает снижение оптической плотности опытного раствора (определение остаточной активности трипсина) на 0.1 при длине волны 410 нм.

Результаты и обсуждение. Обработка растений стрессовыми гормонами в той или иной степени позволяет снизить зараженность растений нематодой. Обработка растений отразилась не только на степени зараженности (снизился балл заражения, образовались небольшие галлы), но на развитии патогена (уменьшились размеры тела и снизилась фертильность галловой нематоды).

Анализ активности ИП в различных органах растений показал, что заражение необработанных растений нематодой вызывает увеличение ингибиторной активности в корнях в 2,7 раза, т. е. в месте локализации паразита. Тогда как в листьях значительных изменений в активности на момент взятия проб не происходило (табл. 1).

**Жасмоновая кислота.** Обработка растений ЖК существенно увеличивала активность ИП в листьях как здоровых, так и зараженных растений. Однако в корнях наблюдалось небольшое снижение активности по сравнению с контролем. Что вполне объяснимо, поскольку ЖК активно

задействована в синтетических процессах именно в зеленых частях растения. Показано, что липоксигеназный метаболизм, вызванный стрессорами разного генеза в большей степени характерен для хлоропластных изоформ (Тарчевский, 2002). С другой стороны, при повышении устойчивости меньшее количество нематод проникает в корни и, следовательно, уровень ИП в корнях не должен быть высоким. Таким образом, можно предположить, что при воздействии ЖК и заражении нематодой может наблюдаться на определенном этапе снижение активности ИП в корнях.

Таблица

**Изменение активности ингибиторов протеиназ в томатах, обработанных ЖК, СК и ЖК+СК**

| Вариант обработки | Листья (И. акт. и.ед/мг) | |
|---|---|---|
| | Здоровые | Зараженные |
| Контроль(вода) | 2,0 | 1,8 |
| ЖК | 4,74 | 4,4 |
| СК | 3,12 | 2,72 |
| ЖК+СК | 1,74 | 2,68 |

| Вариант обработки | Корни (И. акт. и.ед/мг) | |
|---|---|---|
| | Здоровые | Зараженные |
| Контроль (вода) | 0,7 | 1,9 |
| ЖК | 0,4 | 1,16 |
| СК | 1,47 | 0,3 |
| ЖК+СК | 1,6 | 0,4 |

**Салициловая кислота.** СК также увеличивала активность ИП в листьях и в здоровых и зараженных растениях. В корнях здоровых растений активность ИП при обработке увеличилась в 2 раза по сравнению с контролем, однако при заражении активность существенно снизилась.

**ЖК+СК**. Обработка растений этой комбинацией увеличила активность в листьях только в случае заражения. В корнях наблюдалась обратное действие, активность ИП значительно увеличилась в здоровых растениях и снизилась при заражении.

Таким образом, стрессовые гормоны ЖК и СК по-разному влияли на изменение в активности ИП. В листьях здоровых и зараженных растений обработка вызывала увеличение активности. В корнях при заражении происходило снижение активности по сравнению с контролем, что, по всей видимости, связано со слабым проникновением нематод и как следствием проявления устойчивости у растений.

Литература: 1. Зиновьева С.В. и др. //Изв. РАН. Сер. Биол.- 2013. -№3.- С. 332-340. 2.Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений, Москва, Наука, 2002.- 295с. 3.Castognone-Sereno P et al // Genomics.- 2011. -

V.97. - N 1. - P. 29-36. 4. Molders W. et al// Plant Physiol. – 1996. - V. 112.- N.2.- P.787-792.

**Role of stress phytohormones in formation of plant immune response on penetration of parasitic nematodes.** Udalova Zh.V., Zinovjeva S.V. All-Russian K.I. Skryabin Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants, Centre of Parasitology of A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of RAS.

**Summary.** Stress hormones jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) play a key role in immune response of plants infected by various pathogens. Analysis of the activity of proteinase inhibitors (PI) being a marker of systemic induced resistance in various organs of the tomato plant when processing by JA and SA has been done. It has been shown that the highest activity in the leaves of PI during infection root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is observed in the processing of JA. On the other hand SA and its combination with JA reduce the activity of inhibitors in the roots of infected plants what may be associated with an increase of the resistance of plants and less penetration of nematodes in the roots.