

УДК 57

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ВИДА *N. BENTHAMIANA* К ВИРУСУ TBSV ПРИ ОБРАБОТКИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Яхимович Влада Сергеевна

vlada.yahim@mail.ru

Магистрант факультета естественных наук ЕНУ им. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан
Научный руководитель – МукияноваГульжамалСлямгазиевна

Аннотация.Было доказано, что салициловая кислота (СК) способна предотвращать инфекцию растений вида *N. benthamiana*, вызванного вирусом кустистости томатов (TBSV). Чтобы изучить влияние СК на защиту растений от вирусов и то, как СК повышает устойчивость растений к вирусам, были использован метод с помощью окрашивания нитросинимтетразолием (NBT) зараженных растений вирусом TBSV. Лечение СК облегчало индуцированное TBSV окислительное повреждение и увеличивало накопление активных форм кислорода (АФК) во время заражения TBSV *N. benthamiana*. Наши результаты показали, что применение СК у *N. benthamiana* повышает устойчивость к TBSV-инфекции.

Ключевые слова: *N. benthamiana*, салициловая кислота, *Tomatobushy stunt virus* (TBSV), АФК.

Введение.Вирусные заболевания угрожают растениеводству и сельскому хозяйству во всем мире. Растение эволюционировало и разработало сложные механизмы для защиты от вирусных инфекций. Вирус кустистости томатов (TBSV) является типичным представителем рода *Tombusvirus* семейства *Tombusviridae*, переносимый через почву патоген растений, легко передается при механической инокуляции. Симптомы, вызванные TBSV, в значительной степени зависят от растения-хозяина и проявляются в виде некротических и хлоротических поражений. Предполагается, что применение экзогенной салициловой кислоты у *Nicotianabenthamiana* повысит устойчивость растений к TBSV-инфекции посредством модулирования гомеостаза АФК путем контроля экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты.

Активные формы кислорода (АФК) постоянно вырабатываются в растениях как побочные продукты различных физиологических и метаболических путей и первоначально были признаны токсичными молекулами, вызывающими окислительное повреждение белков, ДНК и липидов в растениях. АФК включают в себя свободные радикалы, такие как супероксидный радикал и гидроксильный радикал, а также нерадикалы, такие как перекись водорода. Также АФК считаются важной сигнальной молекулой в растениях, и она участвует в регуляции широкого спектра процессов, таких как рост, развитие, защита и ответы на различные абиотические и биотические стрессы. Чтобы использовать АФК в качестве сигнальных молекул, АФК должны поддерживаться на нетоксичном уровне за счет тонкого равновесия между путями продукции. Растения в ходе эволюции развили сложные системы очистки и регуляции для мониторинга окислительно-восстановительного гомеостаза АФК, чтобы избежать чрезмерного накопления АФК в растительных клетках.

В совокупности обработка растений экзогенной СК может повышать устойчивость к вирусам за счет повышения стабильности клеточной мембраны и поддержания

окислительно-восстановительного гомеостаза. Таким образом, предполагается, что СК играет положительную роль в устойчивости *N. benthamiana* к инфекции TBSV.

Материалы и методы

В исследование использовались растения *N. benthamiana*, предварительно обработанные экзогенной СК и зараженные вирусом TBSV. В качестве контрольного образца использовали растения *N. benthamiana* инфицированные вирусом без обработки салициловой кислотой. Мы выбрали в качестве исследования *Nicotianabenthamiana* так как это растение является наиболее широко используемым экспериментальным хозяином в вирусологии растений, в основном из-за большого количества разнообразных растительных вирусов, которые могут успешно заражать его. Кроме того, *N. benthamiana* восприимчива к большому количеству вирусов, что делает этот вид краеугольным камнем исследований вирусов, особенно в контексте сигнальной защиты растений.

Инокуляция вируса и обработка растений экзогенной СК. В этом исследовании в качестве реципиента трансформации использовали *N. benthamiana*. Семена *N. benthamiana* предварительно обрабатывали экзогенной салициловой кислотой с концентрацией 150Мм, и высевали в чашках Петри 7 дней до появления ростков. Затем *N. benthamiana* высаживали в горшки с циклом 16-часовой свет/8-часовой темноты ($100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) при 25°C. В исследовании использовали сеянцы в возрасте 6–7 недель для инфицирования вирусом. TBSV поддерживали в водной суспензии 0,02М фосфатно-солевого буфера при 4°C. Растения *N. benthamiana* инокулировали TBSV на вторичных (верхних) листьях.

Уровни АФК при обработке СК растений *Nicotianabenthamiana*, зараженных TBSV. Через 7 дня после инокуляции, были собраны листья, инокулированные TBSV. Уровень АФК определяли с помощью окрашивания нитросинимтетразолием (NBT) растений после заражения TBSV. Образцы растений экстрагировали в 0.077 М К-фосфатном буфере, рН 8, с добавлением 1,4-дителиотреитол (ДТТ) и 0.5 мМ (ФМСФ), 5 мг поливинилпирролидон и 154.3 мкМ нитросинийтетразолий. Затем центрифугировали образцы 10 мин при 1000 об/мин. Полученный нами супернатант использовали как ферментный препарат для определения уровня АФК по методу Beauchamp, способностью фермента к ингибированию фотохимическому восстановлению титрозоля. Оптическая плотность измеряли при 560 нм.

Результаты и обсуждение

В растениях *N. benthamiana*, обработанных СК, и инфицированных TBSV, не было обнаружено явных признаков проявления заболевания. Тем не менее, растения, инфицированные TBSV без обработки СК проявляли некротические пятна и увядание листьев, что свидетельствует о заражении растения вирусом (рис 1).



а

Рис1. Фенотипическое проявление вируса *TBSV* у растений

а

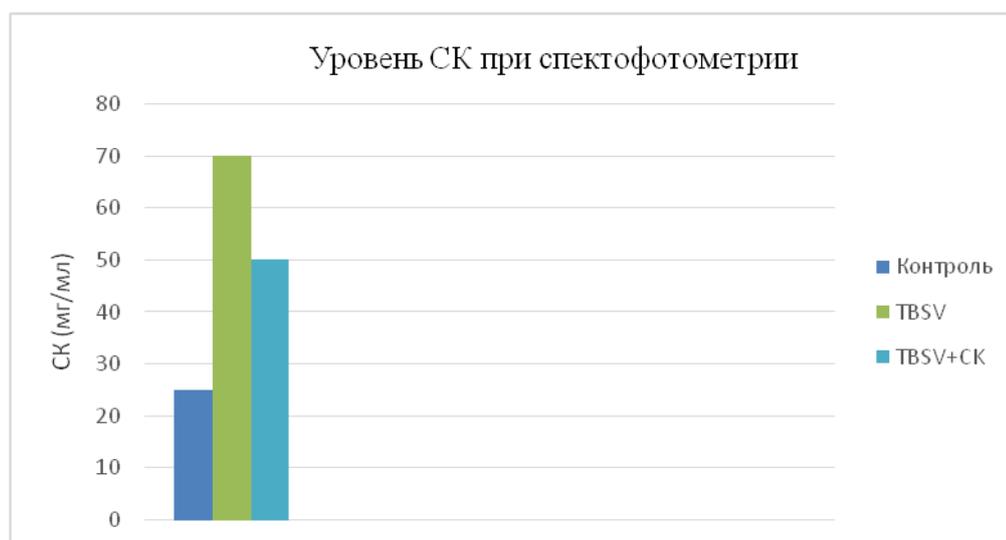
Результаты показали, что небольшое окрашивание в областях NBT наблюдалось у растений в присутствии инфекции TBSV, что говорит о меньшем накоплении АФК в клетках *Nicotianabenthamiana*. И в листьях обработанной СК произошло интенсивное окрашивание, что свидетельствует о большие выработки АФК (рис 2). В целом, результаты показывают, что лечение экзогенной салициловой кислотой облегчает повреждение растения вирусом и играет положительную роль в устойчивости *N. benthamiana* к инфекции TBSV.



Рис.2 Накопление АФК в листьях *Nicotiana benthamiana*

Уровень СК определяли УФ-видимой спектрофотометрией при 310 нм. Наши данные показали, что уровень СК был значительно повышен при TBSV –инфекции с обработкой экзогенной СК, но незначительно отличался от только инфицированного растения вирусом TBSV (рис 3). В образцах TBSV+СК уровень салициловой кислоты достиг 70 мг/мл, а в образцах с TBSV уровень СК был ниже и составлял 50 мг/мл, что свидетельствует о большом накоплении СК при обработке экзогенной салициловой кислотой после вирусной инфекции, что подчеркивает важность этого растительного гормона в совместимых взаимодействиях растений и вирусов.

Таким образом, в ходе исследования мы пришли к выводу, что салициловая кислота отвечает за устойчивость растений к вирусным инфекциям, особенно к TBSV.



В следствие этого, внашем исследовании мы доказали противовирусные механизмы СК у *Nicotianabenthamiana*. Наши данные показали, что экзогенная СК регулирует реакции системной резистентности к инфекции TBSV, регулируя состояние окислительно-восстановительного гомеостаза посредством контроля экспрессии генов, кодирующих

антиоксидантные ферменты. Эти данные показывают, что салициловая кислота является важной сигнальной молекулой, которая способна регулировать системную резистентность и обладает большим потенциалом для растений с повышенной устойчивостью к патогенным инфекциям.

Список использованной литературы:

1. Аббинк, Т.Е., Пирт, Дж.Р., Мос, Т.Н., Баулкомб, Д.К., Бол, Дж.Ф. и Линторст, Х.Дж. (2002) «Замалчивание гена, кодирующего белковый компонент кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II, усиливает репликацию вируса в растениях» Вирусология, 295, 307–319.
2. Апель, К. и Хирт, Х. (2004) «Активные формы кислорода: метаболизм, окислительный стресс и передача сигнала» 373–399.
3. Бакстер, А., Миттлер, Р. и Судзуки, Н. (2014) «АФК как ключевые игроки в передаче сигналов стресса у растений». Журнал экспериментальной ботаники, 65, 1229–1240.
4. Дас, К. и Ройчоудхури, А. (2014) «Активные формы кислорода (АФК) и реакция антиоксидантов как поглотителей АФК во время экологического стресса у растений». 53.