

КУЗНЕЦОВА ЕВГЕНИЯ НИКОЛАЕВНА

**РОЛЬ СВЕТА В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ТОМАТА К ВИРУСУ
ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ**

03.00.05 – ботаника

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре физиологии растений и биотехнологии
Томского государственного университета

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Карначук Раиса Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Олонова Марина Владимировна

кандидат биологических наук, доцент Войцековская Светлана Анатольевна

Ведущая организация – Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск

Защита состоится «_21_» января __2004 года в _14___ часов на заседании

Диссертационного совета № Д212.267.09

по адресу: 634050, Томск 50, пр. Ленина, 36

ауд. __119__

С диссертацией можно ознакомиться в

научной библиотеке Томского госуниверситета

Автореферат разослан «_12_» декабря 2003 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета _____

д.б.н., доцент

С.П. Кулижский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время множество исследований посвящено изучению молекулярных механизмов взаимодействия патогенов и растений. Их взаимодействие начинается с контакта, развития быстрых защитных реакций и завершается формированием ответа растения, и подавлением развития инфекции. Ответ растения зависит от включения «защитных генов» и синтеза разнообразных веществ, которые определяют устойчивость растений к возбудителям заболеваний. Большую роль в формировании иммунитета к вирусам у растений играют сигнальные системы клеток. Веществами, участвующими в сигнальных системах, могут быть различные группы эндогенных фитогормонов (Munnik et al., 1995; Grill E., Himmelbach, 1998; Тарчевский, 2000). При проникновении патогена в клетки растения происходит изменение баланса эндогенных фитогормонов. Регуляция гормонального баланса также может осуществляться светом разного спектрального состава (Kohler, 1985; Карначук и др., 1989; 1990; Ahmad, 1999). Кроме того, показана роль синего и красного света в регуляции различных реакций растений (Воскресенская, 1975; Протасова и др., 1981; Карначук, 1989; Ушакова и др., 1997; Тихомиров и др., 1991, 1999).

Одними из основных сигналов для растения являются спектральный свет и различные экологические факторы. Внешние сигналы могут передаваться на внутриклеточные структуры с помощью фитогормонов. Существуют многочисленные данные о том, что эффекты света и гормонов в растениях могут перекрываться в регуляции различных реакций метаболизма растительной клетки. Фитогормоны могут инициировать реакции, запускаемые светом, и наоборот (Moore, 1979; Evans, 1985; Chory et al., 1994; Su, Howwell, 1995). Однако связь между световыми сигналами и уровнем эндогенных фитогормонов мало изучена. Существует предположение, что регуляторная роль света проявляется не только в контроле роста и развития растений, но и в их защитных реакциях в ответ на проникновение вирусов (Shatilo V.I. et al., 2000). Однако в современной литературе очень мало исследований посвящено изучению роли эндогенных фитогормонов, индуцируемых световыми сигналами разного спектрального состава в защитных реакциях на атаку патогенов.

Цели и задачи исследования. Для понимания связи световых сигналов внешней среды с эндогенными регуляторами в формировании устойчивости к патогенам была поставлена следующая цель:

Выяснить роль синего и красного света в регуляции роста, его влияние на титр вируса табачной мозаики (ВТМ) и баланс эндогенных фитогормонов в растениях томата, инфицированных ВТМ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Проанализировать особенности роста и содержания фотосинтетических пигментов, исходный уровень эндогенных фитогормонов в здоровых и зараженных растениях томата на белом свете.
- 2) Определить оптимальный вариант освещения для формирования устойчивости растений томата к ВТМ.
- 3) Исследовать влияние синего и красного света на рост, титр ВТМ и содержание эндогенных фитогормонов в растениях томата, контрастных по устойчивости.

Научная новизна. Полученные экспериментальные данные вносят вклад в развитие представлений об участии света в устойчивости растений к патогенам. Впервые показана возможность формирования фотоиндуцированной устойчивости растений томата к вирусам. Показано, что различные по восприимчивости зараженные растения томата неоднозначно реагируют на облучение светом разных участков спектра - синим и красным. Это проявляется в изменении титра ВТМ, уровня эндогенных фитогормонов, которые могут быть участниками сигнальных систем растений. Определена оптимальная экспозиция и продолжительность досвечивания спектральным светом растений томата для инициации процессов устойчивости. Продемонстрирована возможность участия цитокининов и абсцизовой кислоты в формировании устойчивости растений томата при облучении спектральным светом.

Практическая значимость работы. Результаты данной работы позволяют разработать экологически чистую технологию профилактики заболеваний растений закрытого грунта. Полученные результаты могут использоваться в учебном процессе при чтении курсов: «Иммунитет растений», «Физиология и биохимия больного растения».

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Возможность фотоиндуцированной устойчивости растений томата к ВТМ.
2. Зависимость устойчивости растений томата к ВТМ от экспозиции и периода досвечивания синим и красным светом.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на XXXV, и XXXX Международной студенческой научной конференции «Студент и научно – технический прогресс» (Новосибирск 1997, 2002); Всероссийском совещании физиологов растений, посвященном 120-летию ТГУ (Томск, 1998); V и VI Международной конференции «Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях» (Москва 1999, 2001); Международном симпозиуме «Induced resistance of plants» (Greese, 2000); 3-й Международной конференции «Биоресурсы и вирусы» (Киев, 2001); VIII Всероссийской студенческой конференции «Экология и проблемы защиты окружающей среды» (Красноярск, 2001); 2-й Международной конференции по анатомии и морфологии растений (С-Петербург, 2002); VI Международной телекоммуникационной конференции студентов и молодых ученых (Москва 2002); V Съезде общества физиологов растений (Пенза, 2003).

Публикации. По теме работы было опубликовано 2 статьи и 26 тезисов.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 154 страницах, содержит 40 рисунков и 23 таблицы. Работа состоит из введения, шести глав (обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов экспериментов), заключения, выводов и списка использованной литературы (80 работ на русском языке, 126 – на иностранных языках).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Состоит из двух разделов, в которых представлены сведения о физиолого–биохимической природе вирусного патогенеза. Проведен анализ работ о транспорте вируса в зараженных растениях, и на многочисленных примерах показаны защитные реакции растений на проникновение патогена. Также рассмотрены данные о влиянии света различных участков спектра на биохимические и морфометрические реакции растений. Охарактеризованы фоторецепторы растений и возможные механизмы преобразования светового сигнала в физиологические реакции растений.

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. *Lycopersicon esculentum* L., томат - травянистое однолетнее растение. Широко применяется как модельный объект в научных исследованиях, поскольку у этой культуры наиболее полно изучен геном, построены детальные карты хромосом, и ее можно культивировать как в полевых, так и тепличных условиях. В работе использовали растения томата сорта Дубок, восприимчивый к ВТМ, а также мутантные линии, полученные из коллекции ВНИИ садоводства и овощеводства (г. Лесной городок, Московской обл.), любезно предоставленные Балашовой Н.Н. Мутантная линия томата (Mo) 382, отличается от дикого типа (сорт Marglobe) тем, что несет ген *rava* (локализован в IV хромосоме, 34 локусе), маркерным признаком, которого являются загнутые книзу листья тускло-серо-зеленого цвета, более опушенные, удлиненные, толерантный к ВТМ₀, отличающийся высокой продуктивностью. Мутант 464, несет ген Tm (tobacco-mosaic virus resistance) экспрессия которого подавляет накопление штамма ВТМ₀ и формирование мозаичных симптомов, устойчивый к ВТМ.

Эксперименты с использованием света различного спектрального состава В эксперименте по досвечиванию синим (СС) и красным (КС) светом, использовали галогеновые лампы КГМ 24-150. Интенсивность светового потока составляла 10 ммоль/м²с. Свет галогеновых ламп пропускали через цветные силикатные стекла, любезно предоставленные проф. А.А. Тихомировым, (Красноярск). Фильтры синего участка спектра имели λ_{max} = 420 нм, ширину полосы 80 нм, пропускание в воздухе - 30%, красного - λ_{max} = 680 нм, ширину полосы 60 нм, пропускание в воздухе - 85%. В фазе четырех листьев томаты досвечивали синим и красным светом до заражения, затем в фазе четырех листьев после заражения. Экспозиция спектрального света составляла 5, 15, 45 минут. Растения в фазе четырех листьев заражали вирусом табачной мозаики (обыкновенный штамм). Инокуляцию ВТМ проводили на неотделенных листьях. Инфекционная нагрузка составляла 30 нг ВТМ (штамм V₀) на растение.

Постановка экспериментов с использованием контрастных по устойчивости растений томата и спектрального света

Здоровые и инфицированные растения всех генотипов досвечивали СС и КС при экспозиции в 5, 15 и 45 минут и различной продолжительностью: разовая (суточная), восьмисуточная, и в разные периоды роста: до и после инокуляции.

В ходе каждого эксперимента фиксировали растительный материал. Измеряли морфометрические показатели – высоту растений, площадь листьев, содержание фотосинтетических пигментов, спектрофотометрическим методом (Шлык, 1971): до заражения, после фототерапии и на 10, 20 и 30 сутки патогенеза. Накопление антигена ВТМ регистрировали с помощью ELISA - метода в течение всего патогенеза. Выделение эндогенных гормонов проводили из навески сырого растительного материала: свободных и связанных индолилуксусной (ИУК) и абсцизовой кислот (АБК) (Кефели, Турецкая, 1966), свободных цитокининов (Негрецкий, 1988), свободных и связанных гиббереллинов (ГА) (Ложникова и др., 1973). Идентификацию гормонов осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии, используя стандартные метки. Учитывая, что ГА₁, ГА₃, а также ГА₄ и ГА₇ не разделяются и элюируются в виде общих зон (Обуг и др., 1983), анализировали их смеси, которые соответственно обозначали как ГА_{1,3}, ГА_{4,7}. Количественное определение фитогормонов проводили с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). Определяли содержание цитокининов, ИУК, АБК (Кудоярова и др., 1989), ГА (Холодарь и др., 1995). Эксперименты проводили в 3-х биологических повторностях, определение уровня фитогормонов - в 3-х биологических и 6-ти аналитических повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью специализированного пакета «Statistica 6.0», использовали корреляционный анализ. В таблицах и на рисунках приведены данные в виде средних арифметических с доверительными интервалами (P= 0,95).

3. ВЛИЯНИЕ ЗАРАЖЕНИЯ ВТМ НА РОСТ, СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И БАЛАНС ЭНДОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА БЕЛОМ СВЕТУ

Для оценки устойчивости к ВТМ различными авторами используется ряд показателей: накопление антигена вируса, симптоматика, высота растений, сырая биомасса, содержание эндогенных фитогормонов и др. (Рубин и др., 1975; Ладыгина и др., 1966; Whenham et al., 1986; Watanabe et al., 1987; Шатило и др., 1997). Одним из наиболее эффективных показателей устойчивости к ВТМ в настоящее время служит оценка накопления антигена в листьях растений (Mas, Beachy, 1999). При анализе накопления антигена ВТМ по результатам ИФА самым устойчивым среди изучаемых линий томатов оказался Mo 464, противоположным ему вариантом – восприимчивый сорт Дубок. В инфицированных растениях томата сорта Дубок титр ВТМ на белом свете увеличивается в течение всего патогенеза и к 30 дню характеризуется самым высоким уровнем содержания: в 2,5 – 4,5 раза большим по сравнению с остальными вариантами (табл. 1). В толерантных растениях Mo 382 и устойчивых Mo 464 также происходит накопление ВТМ в листьях, однако, не столь интенсивное, как в листьях сорта Дубок. Анализируя сырую биомассу растений, в ходе эксперимента было выявлено, что у контрольных растений этот показатель выше, чем у инфицированных. У толерантного Mo 382 здоровые растения в 1,6 раза превосходят по биомассе зараженные (рис. 1).

Накопление вирусных частиц в инфицированных листьях томата,
нг/г сырого веса

Варианты	1 сутки патогенеза	2 сутки патогенеза	10 сутки патогенеза	20 сутки патогенеза	30 сутки патогенеза
Сорт Дубок	5,9±0,20	7,9±0,01	14,3±0,03	36,3±0,10	50,9±0,70
Мо 382	1,6±0,03	3,1±0,60	5,9±0,01	12,9±0,02	30,4±0,70
Мо 464	0,6±0,01	1,7±0,40	4,7±0,60	9,9±0,40	12,3±0,60

Сырая биомасса здоровых растений восприимчивой линии больше в 1,5 раза, чем инфицированных ВТМ (рис. 1). Полученные результаты согласуются с исследованиями, в которых показано, что у большинства растений томата высота здоровых и больных растений различна, а по биомассе здоровые растения превосходят зараженные. Поражение растений ВТМ приводит также к значительному снижению урожайности томатов (Шатило и др., 1997).

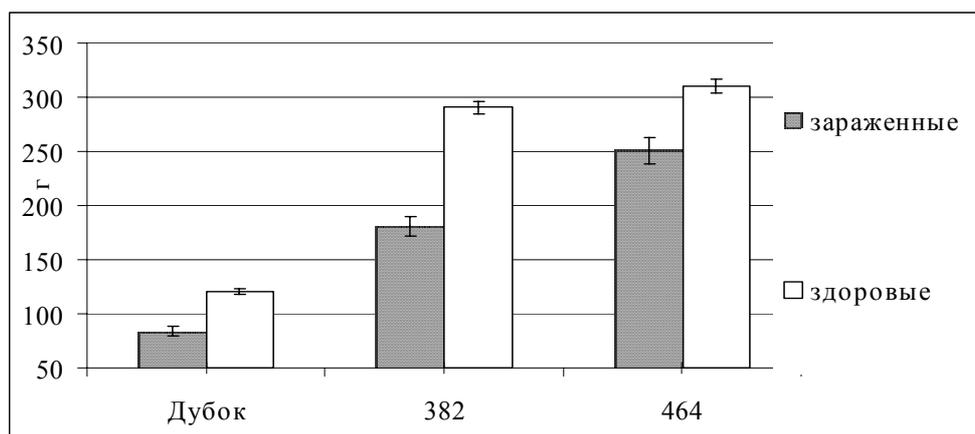


Рисунок 1. Сырая биомасса растений томата, выращенных на белом свете

Известно, что развитие вирусного патогенеза связано с изменением структуры и функции фотосинтетического аппарата растений. Многими авторами было показано, что существует взаимосвязь между устойчивостью растений томата к ВТМ и стабильностью структуры хлоропластов (Реунова и др., 1985; Цоглин и др., 1987; Лапшина и др., 1993; Шатило и др., 1997; Максимов и др., 2002). В толерантных Мо 382 и устойчивых Мо 464 содержание хлорофилла а и b на начальных этапах патогенеза практически не изменялось в зараженных растениях по сравнению со здоровыми вариантами. На 10 сутки патогенеза в зараженных восприимчивых растениях сорта Дубок продолжает снижаться уровень хлорофиллов а и b, тогда как в устойчивых и толерантных растениях таких изменений не наблюдается (рис. 2), что говорит о возможной энергетической связи репродукции ВТМ с хлоропластами. Об этом также свидетельствуют данные электронно-микроскопических исследований, показывающие наличие вируса в матриксе пластид клеток листьев табака (Бужоряну, 1986; Culver et al, 1991).

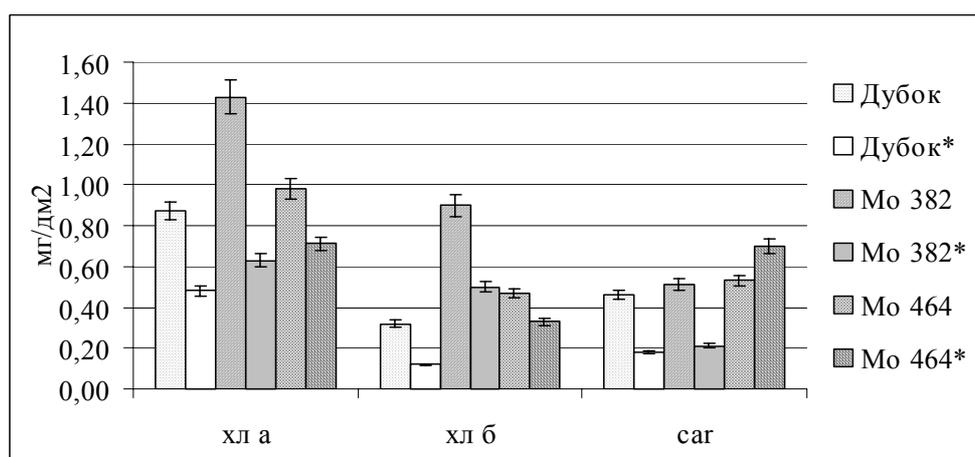


Рисунок 2. Содержание пигментов (хл а – хлорофилл а, хл б – хлорофилл b, саг – каротиноиды) на 10 сутки патогенеза в листьях растений томата (* - растения, инфицированные ВТМ)

В толерантных и устойчивых растениях падение содержания хлорофилла а невелико (рис. 2). Повышение уровня свободной АБК в 3,5 раза на начальном этапе патогенеза в зараженных ВТМ восприимчивых растениях может служить еще одним подтверждением тому, что АБК – это гормон стрессового ответа на внедрение патогена. В инфицированных растениях сорта Дубок на протяжении всего опыта уровень этого фитогормона оставался высоким (табл. 2). Вероятно, длительное поддержание высокой концентрации АБК у восприимчивых растений томата, приводит к формированию совместимых взаимоотношений между высокоспециализированным патогеном и хозяином (Максимов и др., 2002). В толерантных зараженных растениях Мо 382 уровень АБК в 1,5 – 2 раза выше, чем в здоровых (табл. 7). Обнаружено, что в инфицированных ВТМ устойчивых растениях содержание свободной АБК ниже в 6 – 10 раз, чем в восприимчивых (табл. 2).

Таблица 2

Содержание АБК свободных форм, в растениях томата, нг/г сырого веса

Варианты/ сутки патогенеза	10	20	30
Сорт Дубок	8,4±0,3	7,2±0,2	10,7±0,1
Сорт Дубок*	35,6±0,9	32,9±0,8	41,2±0,5
Мо 382	4,8±0,1	6,4±0,3	7,8±0,2
Мо 382*	9,1±0,4	10,5±0,3	12,7±0,4
Мо 464	5,4±0,1	4,7±0,1	3,3±0,1
Мо 464*	7,7±0,05	6,5±0,07	5,6±0,01

* - растения, инфицированные ВТМ

Это свидетельствует о противоположной направленности физиологических реакций в растениях томата, контрастных по устойчивости. В листьях растений наблюдалось значительное различие между общим содержанием ЦК и содержанием индивидуальных цитокининов: ИПА, зеатина (рис. 3) и рибозида зеатина.

В листьях зараженных восприимчивых растений содержание ИПА и зеатина в 2,1 – 2,7 раза ниже, чем в толерантных Мо 382, и в 9,6 – 11,3 раза ниже, чем в устойчивых формах (рис. 3). Анализируя полученные данные, можно предположить, что более высокое содержание активных форм ЦК является одним из факторов устойчивости растений к вирусным заболеваниям.

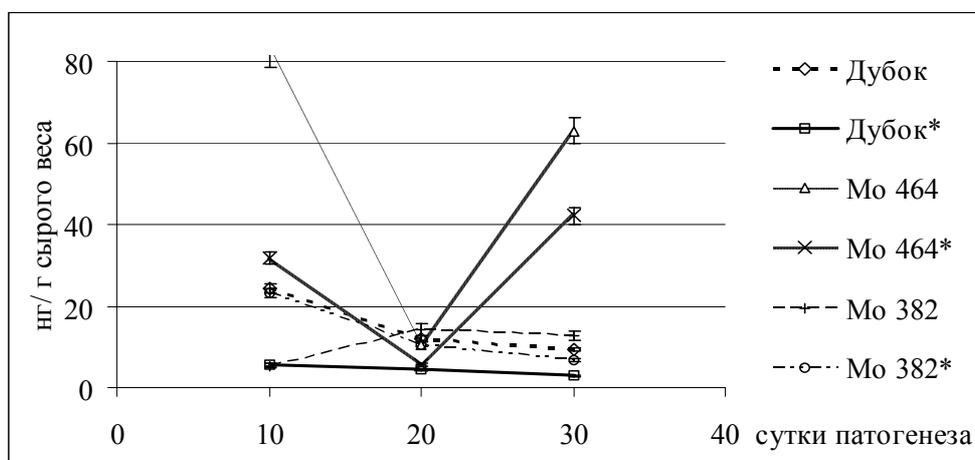


Рисунок 3. Содержание зеатина и ИПА в листьях растений томата (* - растения, инфицированные ВТМ)

В настоящее время, в литературе нет однозначных указаний на то, что эндогенный уровень ИУК и ГА связан с вирусоустойчивостью растений (Вольнец и др., 1993; Шакирова, 1999). Так в зараженных листьях восприимчивых томатов сорта Дубок происходит увеличение содержания свободных форм ИУК в 2,5 – 1,6 раз. Уровень связанной ИУК возрастает незначительно.

Фитогормоны, функционирующие как компоненты или индукторы сигнальных систем, например: АБК или ЦК, являются неотъемлемой частью клеточной сигнальной сети и возможно могут оказывать значительное действие на вирусный патогенез. Более того, не всегда фактор регуляции транскрипции может быть активирован только одним видом сигнальной системы, для этого часто необходимо несколько сигнальных систем (Тарчевский, 2000).

4. ВЛИЯНИЕ СИНЕГО И КРАСНОГО СВЕТА РАЗЛИЧНОЙ ЭКСПОЗИЦИИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ НА НАКОПЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВТМ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА.

Регуляторная роль света не ограничивается только процессами роста и развития, но и затрагивает такие важные аспекты, как устойчивость растения к патогенам, в том числе и к вирусам (Шатило и др., 1997). Эффективным участком спектра при досветке в 15 минут для инфицированных растений оказался синий свет, тогда как красный свет с экспозицией в 15 минут индуцировал образование частиц вируса после заражения в 2- 2,5 раза выше по сравнению с синим. Инфекционность в восприимчивых растениях сорта Дубок снижается при экспозиции в 15 минут синего света (табл. 3).

Титр ВТМ в листьях растений сорта Дубок на синем свете (нг/г сырого веса)

Сутки патогенеза	1	2	10	20	30
Досветка до заражения 5 мин	2,1±0,01	3,1±0,04	76,9±0,05	73,4±1,32	121,0±3,65
Досветка до заражения 15 мин	2,8±0,25	13,8±0,22	64,3±0,52	71,0±3,25	20,3±2,58
Досветка до заражения 45 мин	7,6±0,20	55,1±0,23	76,2±1,23	63,8±4,12	40,6±3,64
Досветка после заражения 5 мин	22,0±0,03	2,5±0,02	82,2±2,56	74,6±2,56	130,0±2,47
Досветка после заражения 15 мин	2,4±0,11	9,9±1,34	60,6±3,15	45,5±5,89	30,0±1,47
Досветка после заражения 45 мин	38,0±0,19	78,0±1,29	59,4±1,20	46,3±1,46	70,1±5,36

Таблица 4

Титр ВТМ в листьях растений сорта Дубок на синем свете (нг/г сырого веса)

Варианты	1 сутки патогенеза	2 сутки патогенеза	10 сутки патогенеза	20 сутки патогенеза	30 сутки патогенеза
Разовая досветка*	4,8±0,10	7,4±0,40	18,8±0,07	30,6±1,30	49,5±1,50
Разовая досветка**	8,5±0,30	12,1±0,20	18,2±0,80	25,3±1,10	37,7±1,04
Восьмисуточная досветка*	8,2±0,04	9,7±0,10	15,8±0,02	23,6±0,80	25,7±1,02
Восьмисуточная досветка**	10,5±0,50	11,3±0,50	17,2±0,60	30,1±1,00	35,2±0,80
Белый свет	5,9±0,20	7,9±0,01	14,3±0,03	36,3±0,10	50,9±0,70

* - до инфицирования

** - после инфицирования

Выявлено, что наиболее благоприятно на зараженные растения влияет восьмисуточная досветка синим светом до инфицирования (табл. 4). В этом варианте и в вариантах разовой досветки титр вируса ниже, чем на белом свете в 1,5 – 2 раза (табл. 4).

Разовое досвечивание как красным, так и синим светом не оказывает влияния на содержание антигена ВТМ в листьях восприимчивых растений (табл. 4). Вероятно, разовая досветка синим и красным светом недостаточна для запуска биохимических защитных реакций растений. В устойчивых растениях Мо 464 и толерантных Мо 382 досветка синим светом до заражения в течение восьми суток оказывает благоприятное воздействие, снижая титр вируса в листьях в 1,6 – 2 раза по сравнению с вариантами досвечивания после заражения.

5. ВЛИЯНИЕ СИНЕГО И КРАСНОГО СВЕТА НА РОСТ, СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ГОРМОНАЛЬНЫЙ БАЛАНС РАСТЕНИЙ ТОМАТА ЗАРАЖЕННЫХ ВТМ

Известно, что действие света не ограничивается его энергетической ролью в фотосинтезе, а распространяется на множественные системы контроля роста и развития растения (Воскресенская, 1978).

Нами показано, что выращивание растений томата всех изучаемых линий на синем свете сопровождается торможением роста стебля, тогда как на красном участке спектра наблюдается обратная тенденция (рис. 4). На освещение синим светом здоровые восприимчивые растения сорта Дубок и толерантные растения Мо 382 реагировали снижением высоты на 20 – 50% (рис. 4).

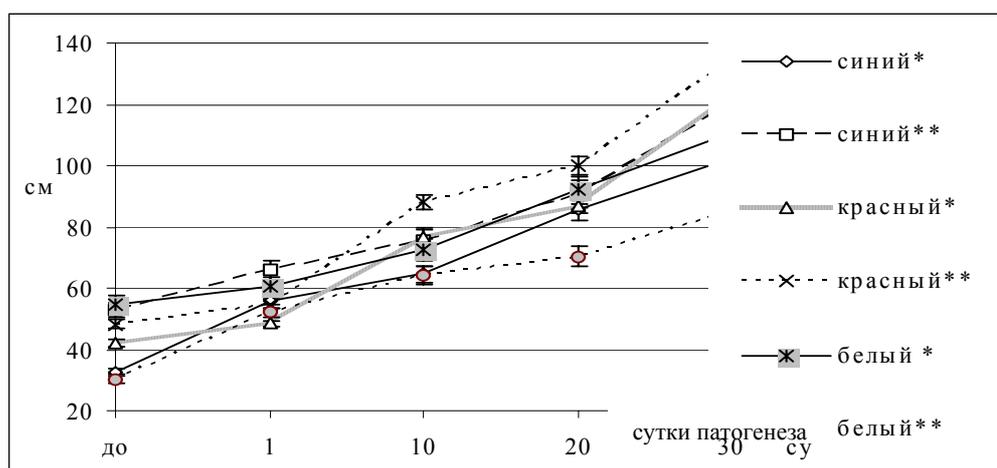


Рисунок 4. Высота толерантных растений Мо 382 (* - здоровые, ** - инфицированные ВТМ)

Рядом авторов показано, что выращивание растений на синем свете сопровождается торможением роста стебля, уменьшением площади листьев, увеличением их толщины; кроме того, наблюдается задержка старения листьев (Карначук и др., 1988; Протасова и др., 1990; Тихомиров и др., 1991).

Освещение красным светом обоих генотипов, восприимчивых и толерантных, увеличивает высоту инфицированных растений по сравнению с растениями, выращенными на белом свете, в 1,5 раза в течение патогенеза (рис. 4). Синий свет на 10 сутки патогенеза на здоровые и инфицированные восприимчивые растения сорта Дубок и толерантные Мо 382 не оказывает значительного действия, тогда как площадь листьев зараженных устойчивых Мо 464 увеличивается в 1,5 – 2 раза (табл. 5).

На 30 сутки патогенеза во всех вариантах картина меняется, и синий свет инициирует увеличение площади листьев этих вариантов в 1,5 – 2 раза (табл. 5). Красный свет снижает эти параметры. Таким образом, синий участок спектрального света действует на зараженные растения томата в основном через снижение высоты растений, увеличение площади листа и биомассы. Однако реакция зараженных растений разных генотипов на синий участок спектра проявляется на разных этапах патогенеза (табл.5).

Таблица 5

Площадь листьев растений томата, см²

Варианты досветки	Белый*	Белый**	Синий*	Синий**	Красный*	Красный**
Сорт Дубок						
10 сутки патогенеза	10,2±0,1	11,3±0,3	10,4±0,4	15,2±0,6	17,4±0,4	20,6±0,7
30 сутки патогенеза	30,5±0,4	20,8±0,5	37,7±0,2	28,6±0,1	20,3±0,8	21,8±0,6
Мо 382						
10 сутки патогенеза	16,7±0,7	15,4±0,6	13,7±0,4	18,3±0,4	17,3±0,3	16,4±0,3
30 сутки патогенеза	47,3±0,1	38,8±0,7	55,4±0,7	39,3±0,7	37,3±0,1	35,4±0,5
Мо 464						
10 сутки патогенеза	17,7±0,2	19,4±0,5	16,5±0,7	27,3±0,2	19,8±0,4	14,7±0,1
30 сутки патогенеза	52,8±0,1	48,7±0,2	56,4±0,6	45,5±0,8	33,6±0,3	34,2±0,4

* -здоровые, * - инфицированные ВТМ

Показано, что вирусы мозаичной группы в качестве мишени патогенного действия используют хлоропласты, нарушая фотосинтетическую функцию растительной клетки (Реунова и др., 1985; Цоглин и др., 1987; Ладыгина и др., 1996). В настоящее время существует целый ряд доказательств того, что фотосинтез растения подчиняется фоторегулированию (Воскресенская, 1965, 1975, 1976; Walters, Horton, 1995; Карначук, Головацкая, 1998; Тищенко, 2000).

Красный свет в здоровых и зараженных растениях, снижает уровень хлорофиллов в листьях восприимчивого генотипа, начиная с 10 суток патогенеза и концу патогенеза становится ниже в 1,5 – 3 раза по сравнению с остальными вариантами (рис. 5). Освещение синим светом индуцирует образование хлорофилла b в листьях восприимчивых растений: к концу патогенеза его содержание выше в 12,5 – 15 раз, чем в растениях с досветкой красным светом (рис. 20). Для толерантных и устойчивых растений томата показана идентичная картина влияния досветки различными участками спектра, как и для восприимчивых.

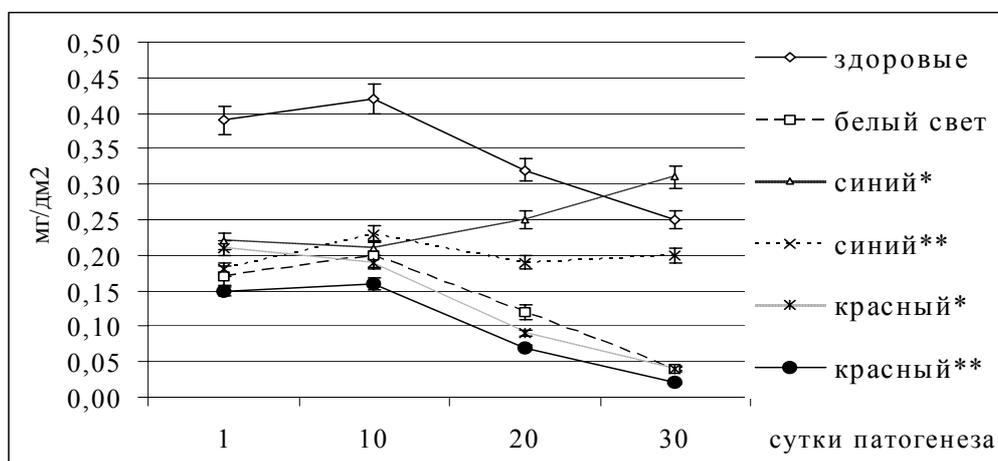


Рисунок 5. Содержание хлорофилла a и b в листьях восприимчивых растений сорта Дубок (* - здоровые, ** - инфицированные ВТМ)

По литературным данным известно, что синий свет индуцирует биосинтез белка и увеличение содержания хлорофилла в незараженных растениях (Воскресенская, 1965, Mohr, 1972). При этом по крайней мере, часть вновь

образуемых белков относится к структурным белкам хлоропласта (Воскресенская и др., 1968). Кроме того, показано, что синий свет обеспечивает устойчивость хлоропласта к старению (Воскресенская, 1975).

Разнообразные регуляторные функции приписывают абсцизовой и жасмоновой кислотам, осуществляемые в ходе развития растений и при их защите от стрессов, они могут быть эндогенными метаболитами, возникающими при воздействии различных внешних факторов, или веществами, индуцирующими устойчивость к патогенам (Пунева и др., 2000).

Облучение синим светом инфицированных восприимчивых и толерантных растений индуцирует образование свободных форм АБК на протяжении всего патогенеза в 5 - 15 раз больше по сравнению с растениями, выращенными на красном свете (табл. 6). Тогда как на красном свете содержание этой группы АБК в восприимчивых и толерантных инфицированных растениях было высоким в течение всего периода болезни растений, по сравнению со здоровыми растениями (табл. 6). Устойчивые растения на досветку спектральным светом реагируют более быстро. Так, например, уже с 10 суток патогенеза заметно, что синий участок спектра вызывает значительное увеличение содержания свободных форм АБК, особенно в варианте инфицированных растений, в 2 раза по сравнению с контролем и в 12 раз по сравнению с растениями, выращенными при освещении красным светом (рис. 6). В здоровых устойчивых растениях на красном участке спектра уменьшается содержание свободных форм АБК в 2,2 раза по сравнению с зараженными растениями, а в контрольных растениях остается на красном свете в следовых количествах к 30 суткам патогенеза (рис. 6).

Таблица 6

Содержание свободных форм АБК в листьях растений сорта Дубок,
нг/г сырого веса

Варианты	10 сутки патогенеза	20 сутки патогенеза	30 сутки патогенеза
Белый свет*	8,4±0,3	7,2±0,2	10,7±0,3
Белый свет**	35,6±1,2	32,9±1,4	41,2±1,8
Синий свет*	43,2±1,3	39,5±1,1	18,4±0,5
Синий свет**	52,8±1,4	30,4±1,6	13,6±0,2
Красный свет*	25,4±0,8	76,4±3,2	148,7±3,7
Красный свет**	36,4±1,1	80,1±2,4	215,4±5,7

(* - здоровые, ** - инфицированные)

В зараженных растениях может происходить изменение содержания эндогенных цитокининов и соотношения их свободных и связанных форм под действием различных участков спектра (Ладыгина, Бабоша, 1996; Шатило и др., 1997; Шакирова, 1999).

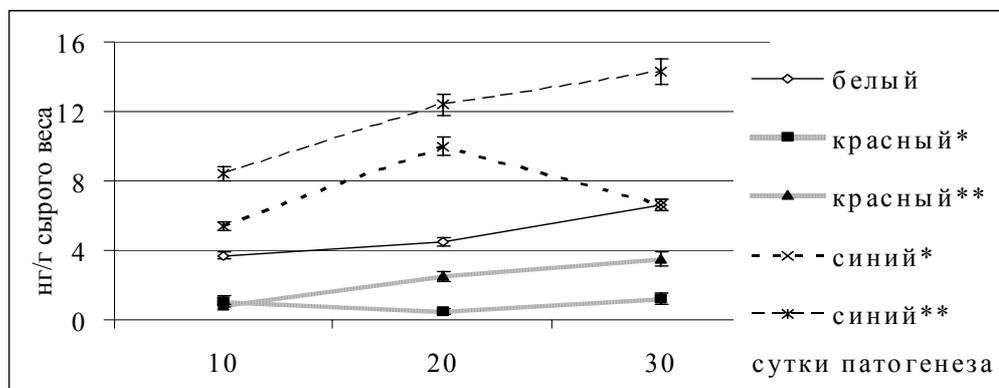


Рисунок 6. Содержание свободных форм АБК в листьях томатов Мо 464 (* - здоровые, ** - инфицированные)

В устойчивом Мо 464 и толерантном Мо 382 генотипах досветка синим светом инфицированных растений, индуцирует образование индивидуальных форм ЦК – зеатина и ИПА. В течение всего патогенеза их содержание в листьях зараженных растений с досветкой превышает содержание этих форм в растениях, выращенных на белом свете в 2 - 4 раза (рис. 7).

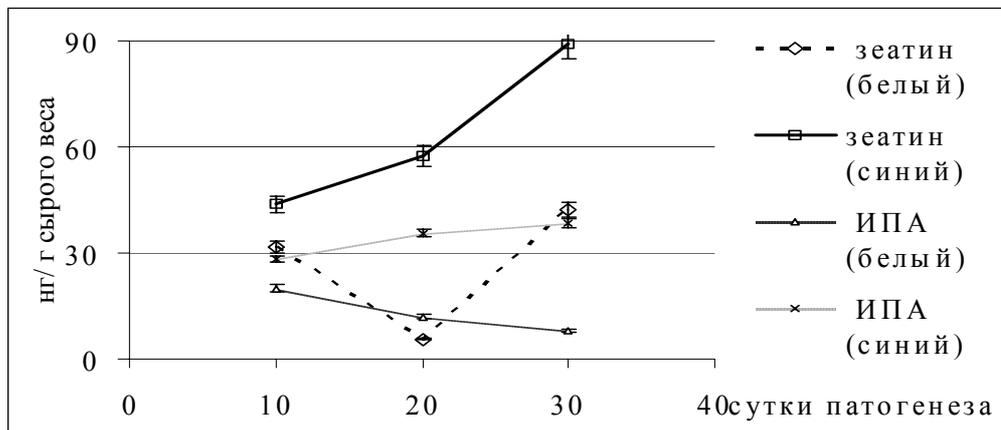


Рисунок 7. Содержание цитокининов в листьях инфицированных Мо 464

Красный свет оказывает ингибирующее действие на накопление зеатина и ИПА (рис. 7, 8). Досветка красным участком спектра здоровых и инфицированных толерантных растений оказывает различное действие: в первом варианте уровень свободных форм ЦК снижался уже на 10 сутки патогенеза в 2 - 4 раза, тогда как во втором варианте досветки такая картина наблюдается только к 30 суткам патогенеза (рис. 8).

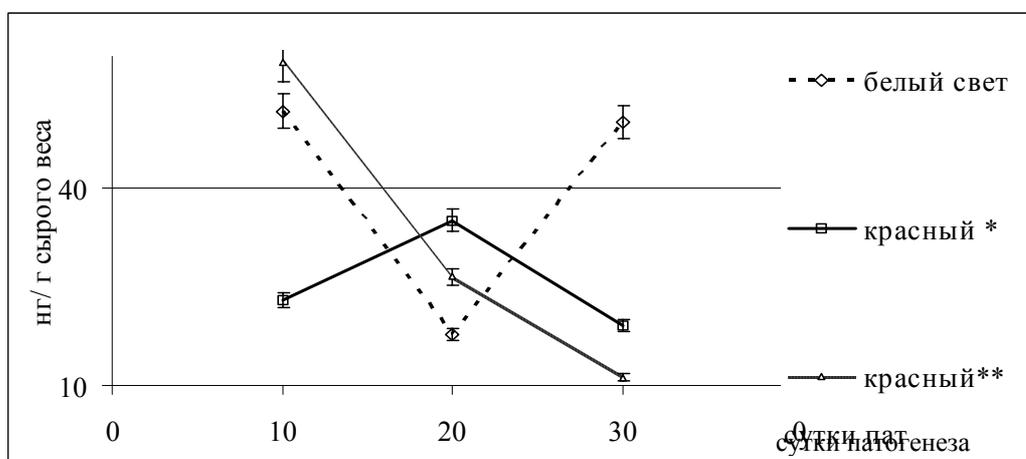


Рисунок 8. Суммарное содержание свободных форм ЦК (З и ИПА) в листьях Мо 464 (*здоровые, ** - инфицированные)

Сано с соавт., показали, что ЦК контролируют синтез салициловой и жасмоновой кислот. В трансгенных растениях табака повышенный уровень эндогенных ЦК (З и РЗ) приводил к увеличению содержания системного индуктора защитных генов – салициловой кислоты и индуцируемых ею кислых PR – белков.

Это сопровождалось возрастанием устойчивости к ВТМ. Авторы считают, что повышенный уровень ЦК приводит к перекрестным сигналам между трансдукционными путями салициловой и жасмоновой кислот (Sano et al., 1996).

Результаты по динамике эндогенных фитогормонов под воздействием спектрального света в зараженных растениях томата были обработаны с помощью корреляционного анализа, который позволил выявить взаимосвязь между уровнем антигена ВТМ в листьях зараженных растений, контрастных по устойчивости к ВТМ и уровнем определяемых фитогормонов. Результаты корреляционного анализа указывают на то, что цитокинины, а именно зеатин участвует в индукции снижения содержания титра ВТМ в листьях зараженных растений на синем свету (соответственно $r = -0,94$ для устойчивых растений, $r = -0,75$ для толерантных и $r = -0,59$ для восприимчивых растений томата), а снижение уровня зеатина ведет к увеличению накопления вирусных частиц. Вероятно, накопление антигена ВТМ зависит от содержания свободных форм АБК в листьях растений томата. Обнаружена достоверная отрицательная корреляция между содержанием антигена ВТМ в устойчивых растениях и содержанием этой формы АБК ($r = -0,85$ для устойчивых растений, $r = -0,68$ для толерантных, $r = -0,52$ для восприимчивых растений). Связь между содержанием гиббереллинов ($GA_{1,3}$, $GA_{4,7}$) и ауксинов свободных форм, и уровнем вирусных частиц (соответственно $r = 0,78$, $r = 0,67$, $r = 0,62$) была обнаружена только в устойчивых растениях, на синем свету, что может свидетельствовать в пользу возможного участия этих групп фитогормонов в процессах индукции устойчивости в растениях невосприимчивых к ВТМ.

Таким образом, в наших экспериментах выявлена взаимосвязь эффектов спектрального света и эндогенных фитогормонов в формировании устойчивости растений к вирусам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших экспериментов вносят вклад в развитие представлений о механизмах фоторегуляции вирусного патогенеза. На примере контрастных по устойчивости линий томатов (восприимчивых, толерантных и устойчивых) показана возможность формирования индуцированной светом защиты растений. Наличие или отсутствие гена устойчивости у растения влияет на течение вирусного патогенеза как при обычных условиях выращивания, так и при воздействии света различного спектрального состава.

Показано, что при выращивании на белом свете наиболее устойчивым к ВТМ оказался Мо 464, имеющий ген устойчивости ТМ 1. Мо 382 также характеризовался пониженной инфекционностью, а наиболее восприимчивым оказался сорт Дубок. Все изучаемые линии при выращивании на белом свете отличаются по содержанию эндогенных фитогормонов. Так, наличие гена устойчивости или его отсутствие влияет на баланс эндогенных фитогормонов в зараженных растениях. Контрастные по восприимчивости растения томата формируют различный баланс эндогенных фитогормонов в ответ на проникновение патогена. В устойчивых растениях Мо 464 в ответ на заражение наблюдается кратковременное увеличение уровня АБК в листьях, что, вероятно, служит сигналом для включения механизмов устойчивости. В восприимчивых растениях долговременное поддержание высокой концентрации АБК приводит к формированию совместных устойчивых отношений между вирусом и растением, способствующими репликации вирусного материала. Вирусный патогенез изменяет содержание ЦК – возможных индукторов устойчивости во всех изучаемых формах томатов. В устойчивых растениях высокое содержание зеатина и ИПА является существенным для развития вирусной устойчивости. Это согласуется с данными Sano et al., (1995) о том, что повышенный уровень эндогенных цитокининов (зеатина и рибозида зеатина) приводит к увеличению содержания системного индуктора защитных генов – салициловой кислоты и индуцируемых ею кислых PR – белков. Соответственно, повышенный уровень ЦК возможно приводит к перекрестным сигналам между трансдукционными путями абсцизовой, салициловой и жасмоновой кислот. Содержание свободной ИУК в восприимчивых растениях томата высоко и возможно способствует подавлению активности защитных белковых систем растения. Следствием изменения гормонального баланса у мутантных зараженных растений томата является снижение скорости роста вегетативных органов.

Синий и красный свет приводят к возникновению противоположных протекающих реакций в зараженных устойчивых и восприимчивых растениях томата. Самыми быстрыми в формировании индуцированных светом защитных реакций на проникновение вирусной инфекции оказались устойчивые растения Мо 464. Тогда как защитная реакция восприимчивых и толерантных растений проявлялась только в середине или даже в конце патогенеза. Синий свет в зараженных растениях приводит к изменению гормонального баланса в сторону увеличения индукторов и компонентов защитных механизмов, инициирует накопление высокой концентрации АБК в листьях, что способствует развитию активной защитной реакции в контрастных по устойчивости растениях. Вероятно, высокие концентрации АБК приводят к токсичному эффекту, подавляющему развитие патогена в клетках. Высокая концентрация АБК в листьях восприимчивых растений способствует высокой литической активности клеток, что в свою очередь обуславливает деградацию вирусных частиц и является важной составной частью активной противовирусной защиты растения (Реунов, 1989).

Синий свет индуцирует резкое накопление зеатина и ИПА, в листьях устойчивых и толерантных зараженных растений. Вероятно, в этих растениях наблюдается аддитивное действие синего света и повышенного содержания ЦК, так как оба этих фактора отвечают за биосинтез хлоропластных белков и хлорофилла и тем самым предохраняют фотосинтетический аппарат от разрушения при заражении (Лядыгина, Бабоша, 1996). Мы предположили, что фотореакция, возбуждаемая синим светом в листьях растений, и цитокинины действуют на общее звено метаболизма, вызывающее биосинтетические процессы, замедляющие течение вирусного патогенеза. Было доказано, что синий свет регулирует активность ядерной РНК – полимеразы, и тем самым стимулирует биосинтез м - РНК и белка (Воскресенская, 1984). Изменение эндогенного уровня цитокининов в свою очередь, вероятно, влияет на протекание вирусного заболевания и накопление антигена ВТМ в листьях томата. При облучении синим светом, в листьях зараженных томатов резко снижается уровень ИУК.

Возможно, синий свет играет роль регулятора биосинтетического баланса, сдвигая последний в сторону синтеза фенольных соединений, которые могут выступать в качестве эндогенных компонентов в механизмах защиты растений. Известно, что фенольные соединения могут регулировать активность ИУК – оксидазы, тем самым изменяя содержание ИУК в тканях растений (Полевой, 1982). Таким образом, свет может модифицировать не только рост и морфогенез растений через систему гормонов и менять интенсивность действия гормонов – стимуляторов и активировать образование природных ингибиторов, но и изменять ход защитных реакций растений в ответ на проникновение патогена.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность фотоиндуцированной устойчивости растений томата.
2. Устойчивость растений томата зависит от экспозиции и продолжительности освещения, а также периода досвечивания синим и красным светом.
3. Синий монохроматический свет повышает устойчивость линий томата как восприимчивых, так и устойчивых к ВТМ.
4. Разовая досветка синим и красным светом оказывается неэффективной в создании устойчивости к ВТМ
5. Красный свет оказывает неблагоприятное воздействие на зараженные растения томата, повышая титр ВТМ.
6. Оптимальный вариант создания фотоиндуцированной устойчивости томата – освещение растений в течение восьми суток синим светом до заражения растений ВТМ.
7. В формировании устойчивости томатов к ВТМ под действием спектрального света принимают участие эндогенные фитогормоны – абсцизовая кислота, зеатин и изопентениладенин.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Артюховская (Кузнецова) Е.Н. Фотоиндуцированная устойчивость мутантных растений томата // Тр. XXXV Межд. конф. «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск. 22 – 24 апреля 1997. – С. 24 –25.
2. Артюховская (Кузнецова) Е.Н. Роль эндогенных фитогормонов в трансдукции светового сигнала в листьях мутантных растений томата // Тр. XXXVII Межд. конф. «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск. 12 – 16 апреля 1999. - Ч.1 – С. 4 –5.

3. Артюховская (Кузнецова) Е.Н., Вайшла О.Б. Влияние спектрального света на ростовые характеристики мутантных растений томата в связи с вирусным патогенезом // «Физиология и биотехнология растений»: Материалы Всерос. совещ., посвященного 120-летию ТГУ, Томск: Изд-во «Факел». – 1998 - С. 23-25.
4. Вайшла О.Б. Карначук Р.А., Артюховская (Кузнецова) Е.Н. О возможности светового контроля вирусных инфекций растений // «Физиология и биотехнология растений»: Материалы Всерос. совещ., посвященного 120-летию ТГУ. Томск: Изд-во «Факел». – 1998 - С. 26-28.
5. Артюховская (Кузнецова) Е.Н., Шпольвиндт А.В. О возможности фототерапии вирусного патогенеза растений // Тр. III межвуз. научн. конф. «Молодежь и наука: проблемы и перспективы». Томск. - 1999.- С. 255 – 257.
6. Вайшла О.Б., Шатило В.И., Артюховская (Кузнецова) Е.Н. К вопросу о новой технологии профилактики вирусных заболеваний томата // Тр. пятой междунар. конф «Регуляторы роста и развития растений». 29 июня – 1 июля 1999. Москва. - Ч.1. - С.13 – 14.
7. Кузнецова Е.Н. Роль эндогенных цитокининов в формировании механизма толерантности к вирусу табачной мозаики под влиянием спектрального света в листьях мутантных растений томата // Тр. VII молод. конф. Ботаников. 15 – 19 мая 2000. - С.- Петербург.- С. 127.
8. Кузнецова Е.Н., Вайшла О.Б. Вклад цитокининов в индуцированную устойчивость растений к фитовирусам // Сборник работ научной молодежи ТГУ «Экология сегодня». – Вып. 1. – Томск, ТГУ, - 2001. – С. 35 – 38.
9. V.I. Shatilo, O.B. Vaishlya, N.N. Balashova, E.N. Kuzneczova Photoiduced resistance of Solanaceae plants to TMV // Symp. "Induced resistance of plants". Greece, 2000. - P. 69 – 70.
10. Кузнецова Е.Н., Вайшла О.Б. Онтогенетическое исследование мутантных растений томата в ходе вирусного патогенеза // Тезисы докл. молод. конф. «Исследования молодых ботаников Сибири». Новосибирск, 20-22 февраля 2001. - С. 45 – 46.
11. Кузнецова Е.Н. Влияние синего света на гормональную регуляцию вирусного патогенеза растений томата // Тезисы 5-й Пушкинской открытой конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», Пушкино. 16 – 20 апреля 2001. - С.36.
12. Кузнецова Е.Н., Вайшла О.Б. Влияние гиббереллинов на взаимоотношения хозяина и паразита в системе мутантные растения томата – вирус табачной мозаики // Тр. 2-й Межд. конф. студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной науки» Самара, 11-13 сентября 2001. – С. 87.
13. Кузнецова Е.Н. Действие спектрального света на вирусный патогенез томатов // Тр. 3-й Межд. конф. «Биоресурсы и вирусы», Киев, Украина. 11-15 сентября 2001. - С. 84, С. 191
14. Кузнецова Е.Н., Мостипан Н.И. Возможное участие цитокининов в индуцированной устойчивости томатов // Тез. докл. VIII Всероссийской студенческой конференции «Экология и проблемы защиты окружающей среды», Красноярск, 25-27 апреля 2001. - С.18- 19.
15. Кузнецова Е.Н. Влияние зеленого света на динамику ауксинов в ходе вирусного патогенеза // Тез. докл. VI Межд. конф. «Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях», 26-28 июня 2001, М: Изд-во МСХА, 2001. - С. 43-44.
16. Шатило В.И., Вайшла О.Б., Кузнецова Е.Н., Балашова Н.Н. Роль цитокининов в противовирусной устойчивости томата к ВТМ // Тез. докл. VI Межд. конф. «Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях», 26-28 июня 2001, М: Изд-во МСХА, 2001. - С. 74.
17. Кузнецова Е.Н. Возможность участия ауксинов в элиситор - индуцируемых сигнальных системах растений томата, инфицированных вирусом табачной мозаики // Тез. XXXIX Межд. студ. конф. «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск, 9-13 апреля 2001. - С. 32.
18. Катышева В.В., Кузнецова Е.Н. Влияние разовой дозировки спектральным светом на вирусный патогенез сверхчувствительных растений томата // Тез. XXXX Межд. студ. конф. «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск, 16-18 апреля 2002. - С. 82
19. Кузнецова Е.Н., Катышева В.В. Реакции патосистемы «томаты – ВТМ» на воздействие спектрального света // Тез. VI Межд. телекоммуникационной конференции студентов и молодых ученых, 10 октября – 20 декабря 2002 г., Москва//<http://molod.mephi.ru/reports.asp?rid=440>
20. Кузнецова Е.Н., Вайшла О.Б. Формирование устойчивости при воздействии красного участка спектра в патосистеме «томаты – вирус табачной мозаики» // Сб. трудов ТСХИ НГАУ, Изд-во: Томск. Вып.5. – 2002. - С.112 - 115
21. Кузнецова Е.Н., Вайшла О.Б. Эффекты красного света в инфицированных клетках мутантных растений томата // 2-я Межд. конф. по анатомии и морфологии растений, С-Петербург, 14 – 18 октября 2002. - С. 125.
22. Кузнецова Е.Н. Возможность участия ауксинов в элиситор - индуцируемых сигнальных системах зараженных растений томата // Тр. V межвуз. научн. конф. «Молодежь и наука: проблемы и перспективы». Томск. - 2001. - С.37 -40.
23. Катышева В.В., Кузнецова Е.Н. Влияние спектрального света на развитие вирусного патогенеза сверхчувствительных растений томата // Тр. V межвуз. научн. конф. «Молодежь и наука: проблемы и перспективы». Томск. – 2002. - С. 58 -59.
24. Кузнецова Е.Н., Катышева В.В. Симптомы заболевания вирусом табачной мозаики на растениях томата, содержащих гены устойчивости // Тез. к 100-летию Педагог. Ун-та, Томск, 2002. - С. 100 - 103.
25. Кузнецова Е.Н., Вайшла О.Б. Эффекты спектрального света различной экспозиции в вирусном патогенезе растений томата // Матер. Междун. конф. посвящ. Памяти проф. Лебедева С.И., Киев, 22 – 23 мая 2003. - С. 27.
26. Кузнецова Е.Н. Спектральный свет и патосистема «сверхчувствительные растения томата – ВТМ» // Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Физиология растений и биотехнология на рубеже веков», Ярославль, 26 – 28 мая 2003. - С. 159
27. Кузнецова Е. Н. Роль света в формировании устойчивости растений томата к вирусу табачной мозаики // Матер. V съезда общ. физиологов растен., Пенза, 11-13 сентября 2003. - С. 119.
28. Кузнецова Е. Н. Влияние синего света на гормональную регуляцию вирусного патогенеза растений томата // Тез. 7-й Пушкинской школы конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» 21-27 апреля 2003. - с.47