Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

УДК: 633.491: 581.198

Антиоксидантная система как ключевой фактор патогенеза вирусных инфекций у картофеля (*Solanum tuberosum* L.)

Бычкова О.В., Мякишева Е.П., Бережных А.В., Полтарацкая Ю.Р., Унжакова М.А.

Алтайский государственный университет

Аннотация

Ответной реакцией растительного организма на биотический стресс является генерация активных форм кислорода (окислительный взрыв), инициирующая цепь последующих защитных реакций. Цель исследования – изучение особенностей развития окислительного стресса и реализации защитных функций у здоровых и пораженных вирусами растений. Степень окислительного стресса определяли по уровню перекисного окисления липидов и содержанию пероксида водорода. Антиоксидантную систему растений оценивали по активности каталазы и пероксидазы. Индикаторами окислительного взрыва при патогенезе служили повышение содержания пероксида водорода (0,087-0,460 мкмоль/г сырой массы) и уровня продуктов перекисного окисления липидов (0,0039-0,0110 мМоль/г сырой массы). У свободных от вирусов образцов эти показатели составляли 0,083 мкмоль/г сырой массы и 0,0029 мМоль/г сырой массы соответственно. При длительном воздействии биотического стресса происходило увеличение активности каталазы до 4,958 мл $O_2 \cdot г^{-1} \cdot мин^{-1}$. Активность пероксидазы в образцах, пораженных вирусами, варьировала от 0,062 до 0,705 $Е \cdot с^{-1} \cdot кг^{-1}$, тогда как в контроле она составляла 0,865 $Е \cdot с^{-1} \cdot кг^{-1}$, что связано с особенностью работы фермента.

Ключевые слова: ФИТОПАТОГЕНЫ, ПАТОГЕНЕЗ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА (АФК), АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА (АОС), КАТАЛАЗА, ПЕРОКСИДАЗА, ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА, ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ (ПОЛ)

Введение

Наличие развитой системы адаптации и механизмов защиты от различных неблагоприятных факторов окружающей среды является необходимым условием

существования растений, поскольку прикрепленный образ жизни не позволяет «уходить» от стресса. Как следствие, у растений сформировалась сложная и многоступенчатая сеть антиоксидантной системы (АОС), играющая ключевую роль в регуляции количества активных форм кислорода (АФК) и поддержании клеточного гомеостаза.

Образование АФК является стандартным показателем действия различных абиотических и биотических стрессов на организм. При этом следует отметить, что АФК, в зависимости от силы воздействующего на клетку патогенного фактора, могут выступать либо индукторами процессов адаптации, либо их накопление вызывает окислительный стресс, что может привести к апоптозу [1].

Термин «окислительный стресс» был впервые предложен Sies и Cadenas в 1985 году, подразумевая нарушение окислительно-восстановительного равновесия вследствие повышенного уровня АФК внутри клетки [2]. Более позднее определение, считающееся последней версией, характеризующей данный термин, описывает его как «дисбаланс между окислителями и антиоксидантами в пользу окислителей, приводящий к нарушению окислительно-восстановительной сигнализации и контроля и / или молекулярный ущерб» [1].

Чрезмерное окисление и восстановление клеточных компонентов одинаково вредно для организма, поэтому поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза имеет решающее значение [3]. По этой причине растения чрезвычайно богаты соединениями с антиоксидантной активностью. Согласно определению, антиоксиданты (АО) представляют собой молекулы, способные ингибировать или подавлять реакции свободных радикалов и задерживать или предотвращать повреждение клеток. АО имея концентрацию более низкую, чем у окисляемого субстрата, значительно задерживают или вовсе препятствуют его окислению [4]. Эти молекулы могут самостоятельно реагировать с АФК, но эффективность удаления выше в реакциях, опосредованных ферментами – аскорбатпероксидазой (АРХ, КФ 1.11.1.11), аскорбатоксидазой (АскО, КФ 1.10.3.3), супероксиддисмутазой (СОД, КФ 1.15.1.1), каталазой (КАТ, КФ 1.11.1.6) и глутатионпероксидазой (ГПО, КФ 1.11.1.9) [5].

Так, низкомолекулярные антиоксиданты удаляют АФК как косвенно, так и напрямую. В частности, косвенным механизмом является хелатирование переходных металлов, которое предотвращает их участие в реакции Хабера-Вайса или Фентона, в то

время как прямой механизм включает отдачу или получение электронов, удаление радикалов и, как следствие, предотвращение их реакции с биологическими молекулами.

Оценка пула АФК а также высоко- и низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы у растений, пораженных вирусом, позволит изучить особенности развития окислительного стресса и реализации защитных функций [6, 7]. Ряд экспериментальных наблюдений свидетельствует о значительной роли этих ферментов в устойчивости растений к патогенезу.

Таким образом, целью данного исследования являлось изучение особенностей развития окислительного стресса и реализации защитных функций у пораженных и свободных от вирусов растений.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали растения картофеля сорта Импала *in vitro* из коллекции Алтайского центра прикладной биотехнологии АГУ в состоянии активного роста. Коллекция включает линии, зараженные вирусами и вироидом (PVS, PVA, PVM, PLRV, PVX, PVY и PSTVd) в различных комбинациях. Перед началом работы было проведено тестирование исходных растений для подтверждения их вирусного статуса методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе QuantStudio 5 с использованием коммерческих наборов (Синтол, Россия). РНК выделяли из зеленых листьев, отобранных со средней части растения, с помощью наборов реагентов DiamondDNA (Россия). Контрольную группу составили неинфицированные образцы картофеля Импала, также прошедшие тестирование.

Уровень ПОЛ определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА), последний, взаимодействуя с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при высокой температуре и кислом значении pH образует окрашенный триметиновый комплекс [8].

Содержание пероксида водорода, обладающего наибольшим временем жизни и являющегося одним из важнейших кислородных редуктантов, определяли спектрофотометрическим методом по Bellincampi с соавт. Метод основан на окислении ионов Fe^{+2} до Fe^{+3} пероксидом водорода; образующиеся ионы Fe^{+3} образуют окрашенные соединения с ксиленоловым оранжевым [9, 10].

Общую активность пероксидазы, основанную на способности бензидина окисляться

пероксидом водорода при участии пероксидазы, изучали по методу А.Н. Бояркина [11]. Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом в супернатанте по скорости ферментативного разложения перекиси водорода при длине волны 240 нм [12, 13].

Для оценки биохимических показателей использовали трёхкратную биологическую и аналитическую повторность. Статистический анализ проводили с использованием пакета MS Excel 2010. Рассчитывали среднее арифметическое значение, его ошибку, а также коэффициент корреляции.

Результаты и их обсуждения

Последствия окислительного взрыва – интенсивное образование АФК – представляют собой неспецифическую ответную реакцию на воздействие стрессовых факторов, в том числе фитопатогенов. Однако активные формы кислорода в низких концентрациях постоянно образуются в ходе нормальных метаболических процессов и выполняют важные биологические функции [14, 15].

К основным видам АФК относят перекись водорода (H_2O_2), которая характеризуется малыми скоростями взаимодействия с органическими субстратами, и является наиболее стабильным типом активных форм кислорода. На рисунке 1 представлено содержание пероксида водорода в листьях картофеля, пораженных различными сочетаниями вирусных инфекций. Результаты демонстрируют резкое увеличение содержания H_2O_2 под влиянием вирусной инфекции по сравнению с контрольными (здоровыми) растениями, вирусная инфекция является мощным фактором, провоцирующим оксидативный стресс. Уровень пероксида водорода в образцах варьировал от 0,083 до 0,460 мкмоль/г сырой массы, при этом его наибольшая концентрация была зафиксирована у растений, зараженных тремя и более вирусами. Это указывает на то, что множественная вирусная инфекция вызывает у растения наиболее сильный окислительный стресс.

Поскольку H_2O_2 выполняет в организме несколько функций, её повышенное содержание при вирусной инфекции может иметь двоякое значение. С одной стороны, оно служит индикатором развития окислительного стресса, с другой стороны, именно H_2O_2 может выступать сигнальной молекулой, запускающей каскад молекулярных, биохимических и физиологических реакций, направленных на формирование адаптационных механизмов и, как следствие, повышение устойчивости растений [16].

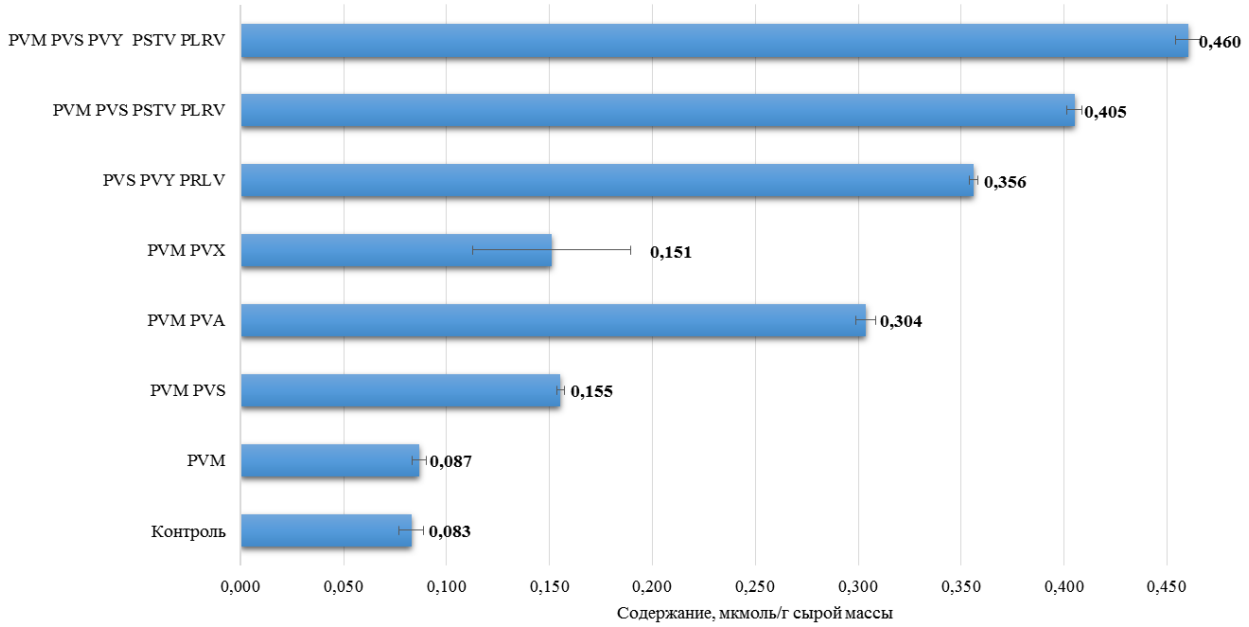

Рис. 1. Содержание пероксида водорода (H_2O_2) в листьях картофеля, инфицированного различными вирусами

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) служит индикатором повреждения клеточных мембран и индуцируется избыточным количеством активных форм кислорода [17]. Запуская цепную реакцию, ПОЛ усугубляет окислительный стресс, создавая липидные радикалы, способные повреждать белки и ДНК [18]. Увеличение перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) приводит к снижению текучести мембран, увеличению утечки электролитов и повреждению мембранных белков [15]. Конечными метаболитами ПОЛ, способными реагировать с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), являются малоновый диальдегид, этан, пентан и другие соединения [19].

Содержание ТБК-реагирующих продуктов представлено на рис. 2. Наиболее сильный окислительный стресс вызывает заражение комплексными вирусными инфекциями: PVM+PVS и PVM+PVS+PVY+PSTV+PLRV. Так, уровень ТБК-продуктов при сочетании пяти типов вирусов достиг максимального значения 0,0100 мМоль/г, что в 2,5 раза превышает показатели одиночной инфекции PVM (0,0039 мМоль/г) и значительно больше, чем в контроле (0,0029 мМоль/г). Таким образом, вирусы картофеля, являются мощными индукторами окислительного стресса, что проявляется в значительном накоплении продуктов перекисного окисления липидов в тканях растения-хозяина.

Антиоксиданты играют ключевую роль в регуляции уровня активных форм кислорода в клетке. Каталаза и различные пероксидазы участвуют в детоксикации

пероксида водорода, катализируя его разложение до воды. При этом каталаза в качестве донора электронов использует вторую молекулу H_2O_2, в то время как пероксидазы для этой цели требуют специфических органических соединений, таких как аскорбат или глутатион [20]. Существуют и другие функциональные различия между этими ферментными системами. В частности, каталаза характеризуется низким сродством к субстрату (H_2O_2) и эффективно работает только при высоких его концентрациях.

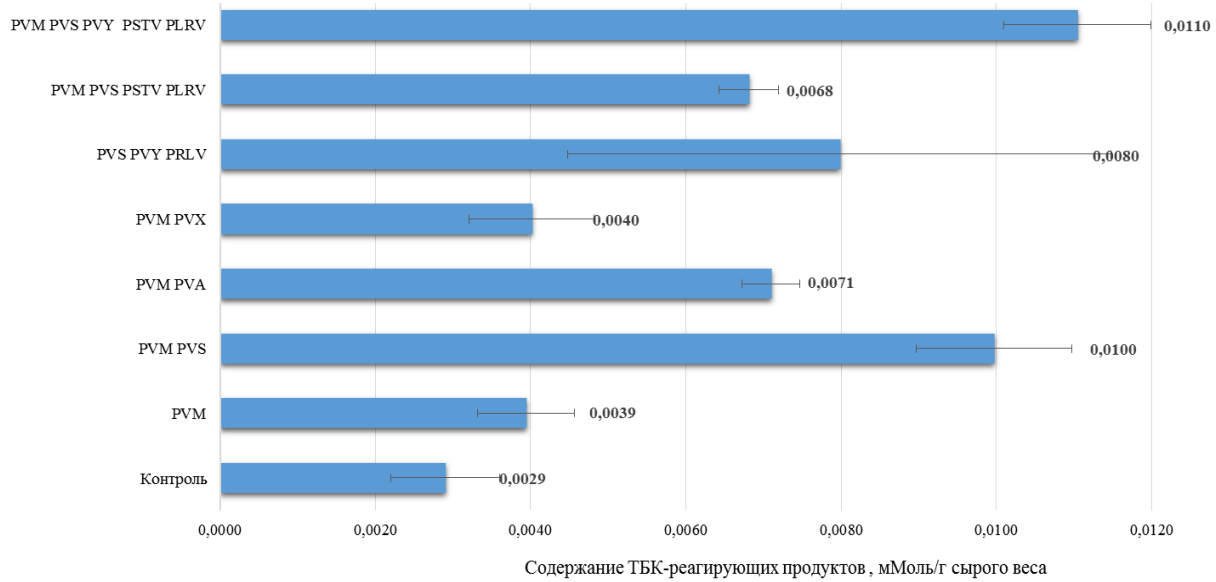

Рис. 2. Содержание ТБК-реагирующих продуктов в растениях картофеля, инфицированных различными вирусами

Динамика каталазной активности в ходе патогенеза имеет важное регуляторное значение. На ранних стадиях инфекции наблюдается снижение каталазной активности [21, 22], что необходимо для проявления устойчивости к фитопатогенам. Сохранение высокого содержания H_2O_2 позволяет ему проявлять антибактериальные свойства. Повышение же каталазной активности приводит к снижению содержания перекиси водорода и, как следствие, к повышению восприимчивости растения к патогенам. Вместе с тем, учитывая губительное действие АФК, в том числе H_2O_2, на клеточные структуры, каталаза выполняет защитную функцию, лимитируя продолжительность жизни активных форм и тем самым предотвращая оксидативное повреждение клеток.

На рис. 3 представлены данные об изменении активности ключевого антиоксидантного фермента каталазы, который расщепляет перекись водорода до воды и молекулярного кислорода. В клетках картофеля наблюдалась тенденция к увеличению

активности каталазы в зависимости от количества и видового состава вирусов, по сравнению с контрольными растениями.

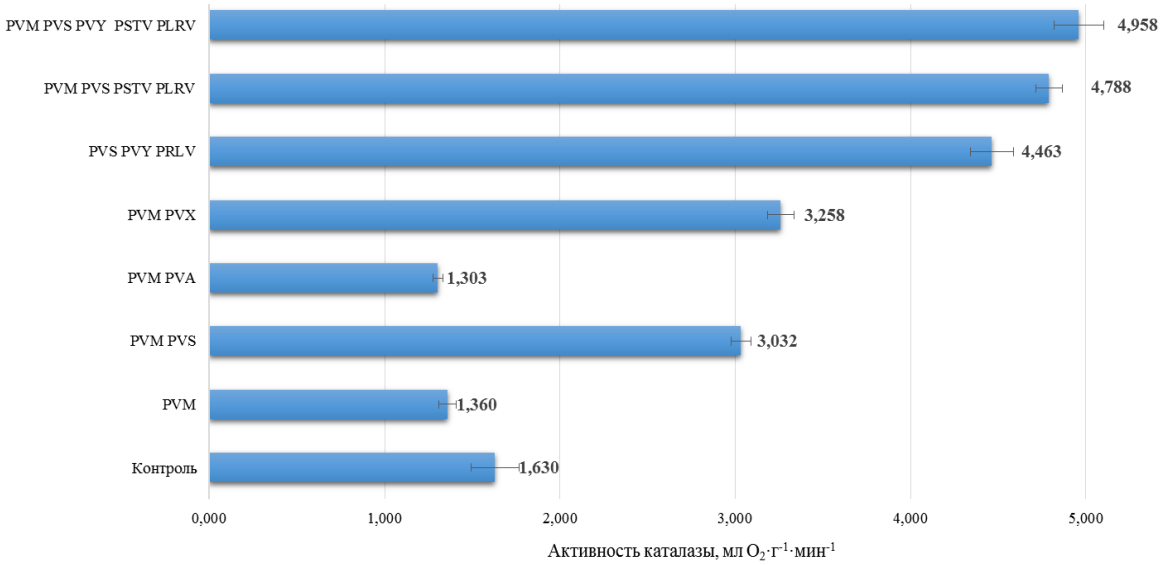

Рис. 3. Активность каталазы в образцах картофеля при инфицировании различными комбинациями вирусов

Однако стоит отметить образцы, пораженные вирусами PVM и PVA+PVS, уровень каталазы у которых достоверно ниже, чем в контрольных образцах. Подобная ответная реакция объясняется видоспецифичностью патогенов. В частности, вирусы PVM и PVS, несмотря на их широкое распространение, относятся к неагрессивным и не оказывают серьезного негативного влияния ни на состояние растений, ни на урожайность. Картофельный вирус PVA также характеризуется слабой степенью вредоносности [23].

Повышение каталазной активности можно рассматривать как защитную реакцию клеток, направленную на их сохранение при длительном биотическом стрессе [24, 16]. Процесс нейтрализации пероксида водорода каталазой происходит с высокой скоростью, однако фермент проявляет активность только при достижении высоких концентраций субстрата [24], что подтверждается выявленной положительной корреляцией (r = 0,76) между уровнем H_2O_2 и активностью КАТ.

Растения индуцируют синтез пероксидазы в ответ на воздействие разнообразных физических, химических и биологических факторов. Пероксидазы катализируют реакции восстановления пероксида водорода с использованием различных восстановителей в качестве субстратов. Эти ферменты присутствуют в различных компартментах клетки: хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, цитозоле. Являясь стресс-индуцируемыми

ферментами, пероксидазы способны участвовать в тонкой регуляции про- и антиоксидантного баланса. Благодаря способности быстро активироваться, пероксидаза одной из первых реагирует на внешние воздействия, что позволяет рассматривать ее в качестве маркера физиологического состояния растения при взаимодействии со средой [25]. Вместе с тем, реакция антиоксидантной системы, включая активацию пероксидаз, демонстрирует видоспецифичность в ответ на действие различных стрессоров. Многочисленные исследования отмечают отсутствие однозначного ответа даже на одни и те же повреждающие факторы [26].

Проведенный анализ выявил статистически значимые изменения в активности ключевого фермента антиоксидантной системы – пероксидазы растений под влиянием вирусной инфекции. Антиоксидантная система служит важнейшим компонентом защиты клетки, обезвреживая активные формы кислорода (АФК), которые в избытке образуются при стрессе, в том числе при патогенной атаке. Максимальная активность пероксидазы наблюдалась в свободных от вирусов образцах картофеля и составляла 0,865 $Е \cdot с^{-1} \cdot кг^{-1}$. Инфицирование вирусами достоверно снижало активность данного антиоксидантного фермента (рис. 4). Максимальное подавление активности наблюдается при комплексной инфекции PVS+PVY+PLRV (0,064 $Е \cdot с^{-1} \cdot кг^{-1}$), что свидетельствует о сильном угнетении фермента, что и указывает на синергетический эффект вирусов в угнетении антиоксидантной системы растения.

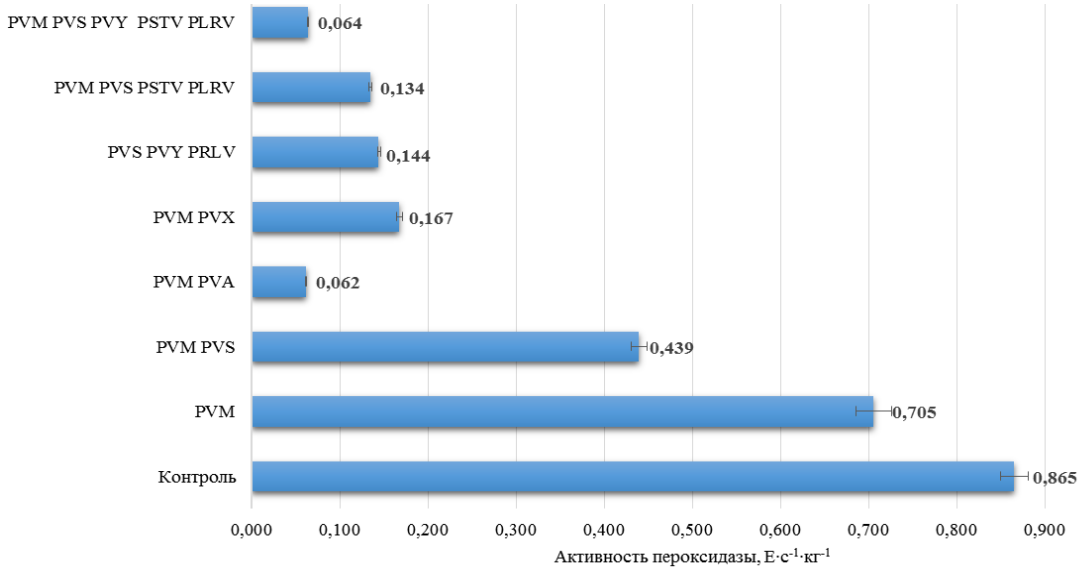

Рис. 4. Активность пероксидазы в образцах картофеля при инфицировании различными вирусами

Участие пероксидазы в сигнальной системе одна - из важных функций в формировании защитной реакции на воздействие патогенов [16]. Обнаруженная в нашем исследовании отрицательная корреляция между активностью пероксидазы и развитием окислительного стресса согласуется с литературными данными о связи уровня данного фермента с устойчивостью растений к патогенам [16, 27]. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что вирусная инфекция подавляет активность ключевого антиоксидантного фермента, что способствует развитию окислительного стресса и снижению защитного потенциала растения. Таким образом, вирусы картофеля не просто индуцируют окислительный стресс, а избирательно подавляют пероксидазное звено антиоксидантной защиты, что может быть ключевым механизмом в преодолении защитных барьеров растения-хозяина.

Выводы

Множественная вирусная инфекция вызывает у картофеля нелинейный окислительный стресс: максимальная интенсивность ПОЛ и накопление H_2O_2 наблюдались при комплексном заражении патогенами.

Вирусы избирательно подавляют ключевое звено антиоксидантной защиты, снижая пероксидазную активность при в 1,5-14 раз относительно контроля при всех вариантах вирусной инфекции.

Каталазный ответ зависит от патогенности вирусов: слабоагрессивные вирусы не индуцировали активность КАТ, тогда как комплексные инфекции вызывали её увеличение до 4,958 мл O_2 г-1·мин-1.

Дисбаланс ферментативной антиоксидантной системы является ключевым фактором вирусного патогенеза, при этом противоположная динамика КАТ (активация) и пероксидаз (подавление) нарушает регуляцию гомеостаза, смещая баланс в сторону прооксидантных процессов и снижая устойчивость растений.

Список использованных источников:

1. Dumanovic J., Nepovimova E., Natic M., Kuca K., Jacevic V. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 11. – Article. 552969. DOI: 10.3389/fpls.2020.552969

2. Sies H. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development // Current Opinion in Toxicology. – 2018. – Vol. 7. – P. 122–126. DOI: 10.1016/j. Cotox.2018.01.002

3. Foyer C.H., Shigeoka S.Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis // Plant Physiology. – 2011. – Vol. 155. – P. 93–100. DOI: 10.1104/pp.110.166181

4. Dumont S. Rivoal J. Consequences of oxidative stress on plant glycolytic and respiratory metabolism // Frontiers in Plant Science. – 2019. – Vol. 10. – Article. 166. DOI: 10.3389/fpls.2019.00166

5. Noctor G., Reichheld J.P., Foyer C.H. ROS-related redox regulation and signalling in plants // Seminars in Cell and Developmental Biology. – 2018. – Vol. 80. – P. 3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013

6. Гусейнова И.М., Мамедов А.Ч., Султанова Н.Ф. Антиоксидантная система у инфицированных нановирусами бобовых растений // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. – С. 1–8.

7. Хозеева Е.В., Зимина Ю.А., Срослова Г.А. Окислительный стресс растений: химия, физиология, способы защиты // Природные системы и ресурсы. – 2020. – Т. 10. – № 4. – С. 30–43. DOI: https:// doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2020.4.4

8. Stewart R.R., Bewley D.J. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // Plant physiology. – 1980. – Vol. 65(2). – P. 245–248. DOI: 10.1104/стр.65.2.245

9. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H2O2 induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants // Plant Physiology. – 2000. – Vol. 122. – P. 1379–1385. DOI: 10.1104/стр.122.4.1379

10. Wolff S. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides // Methods Enzymol. – 1994. – Vol. 233. – P. 182–189. DOI: 10.1016/0003-2697(92)90122-n

11. Четина О.А. Боталова К.И., Кайгородов Р.В. Влияние щелочности и кислотности корневой среды на состояние защитных систем *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. // Физиология растений. – 2020. – Т. 67. – № 2. – С. 177–187. DOI: 10.31857/S0015330320010030

12. Никерова К.М., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Новицкая Л.Л., Подгорная М.Н., Софронова И.Н. Каталазная активность в листовом аппарате у сеянцев березы повислой разных форм (*Betula pendula* Roth.): var. Pendula и var. Carelica (Mercklin) // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2016. – № 11. – С. 68–77. DOI: 10.17076/eb460

13. Beers R.F., Sizer I.W. A spectrometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. – 1952. – Vol. 195. – P. 13–140.

14. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль

активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – № 2. – С. 163–178.

15. Нестеров В.Н., Богданова Е.С., Табаленкова Г.Н., Розенцвет О.А. Перекисное окисление липидов дикорастущих галофитов в условиях Приэльтонья // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т. 16. – № 5. – С. 299–303.

16. Карпун Н.Н., Янушевская Э.Б., Михайлова Е.В. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – № 5. – С. 540–549. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.540rus

17. Петухов А.С., Хритохин Н.А., Петухова Г.А. Перекисное окисление липидов в клетках растений в условиях городской среды // Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2018. – Т. 26. – № 1. – С. 82–90. DOI 10.22363/2313-2310-2018-26-1-82-90

18. Mittler R. ROS are good // Trends in Plant Science. – 2017. – Vol. 22. – No. 1. – P. 11–19. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.002

19. Рогожин В.В., Перетолчин Д.В., Рогожина Т.В. Аскорбиновая кислота – оксидазный субстрат пероксидазы хрена // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2013. – № 1. – С. 81–87.

20. Игнатенко А.А., Репкина Н.С., Таланова В.В. Участие каталазы и пероксидазы в повышении устойчивости пшеницы к низкой температуре // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2018. – №4. – С. 74–82. DOI: 10.17076/them804

21. Павловская Н.Е., Гринблат А.И. Активные формы кислорода и апоптоз у пшеницы и гороха // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № 1. – С. 51–55.

22. Bakalova S., NikolovaA., NedevaD. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds // Bulg. J. Plant Physiol. – 2004. – Vol. 30. – No. 1–2. – P. 64–77.

23. Анисимов Б.В. Вирусные болезни и их контроль в семеноводстве картофеля // Защита и карантин растений. – 2010. – № 5. – С. 12–18.

24. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник Московского городского педагогического университета. – 2016. – № 2(22). – С. 9–23.

25. Акимова Г.П., Соколова М.Г., Верхотуров В.В. Пероксидаза в регуляции фитомикробных взаимодействий // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 1(16). – С. 81–85.

26. Шиш С.Н., Шутова А.Г. Особенности реакции антиоксидантной системы растений *Calendula officinalis* L. и *Nigella sativa* L. на физическое и химическое воздействие // Образование и наука в Беларуси: актуальные проблемы и перспективы развития в XXI веке : сб. науч. ст. Бел. гос. пед. ун-т им. М. Танка. – Минск: БГПУ. – 2014. – С. 322-326.

27. Чесноков Ю.В. Устойчивость растений к патогенам (обзор иностранной литературы // Сельскохозяйственная биология, 2007. – №1. – С. 16-35.

Цитирование: Бычкова О.В., Мякишева Е.П., Бережных А.В., Полтарацкая Ю.Р., Унжакова М.А. Антиоксидантная система как ключевой фактор патогенеза вирусных инфекций у картофеля (*Solanum tuberosum* L.) [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2025. – № 5. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2025/5/st_540.pdf DOI: https://doi.org/10.51419/202155540.