

УДК 632.656:581.1

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КОРНЯХ ТОМАТОВ ПРИ ИНВАЗИИ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДОЙ *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) CHITWOOD, 1949

© 2022 г. Ж. В. Удалова¹, С. В. Зиновьева^{1,*}

Представлено академиком РАН Д.С. Павловым

Поступило 24.04.2022 г.

После доработки 27.05.2022 г.

Принято к публикации 02.06.2022 г.

Проведено исследование активности перекисного окисления липидов, каталазы, супероксиддисмутазы и пероксидазы в корнях растений томатов при экзогенной обработке нанокремнием в концентрации 1.0 мкг/мл при заражении *Meloidogyne incognita*. Показано, что в обработанных Si–НЧ растениях на ранних стадиях паразитирования наблюдается низкая активность ПО и СОД, а также и повышенный уровень ПОЛ, что указывает на образование свободных радикалов (АФК), способных ингибировать жизнедеятельность нематод, а также ограничить формирование гигантских клеток. Во время седентарной стадии, на этапах питания, развития и продуцирования яиц в корнях обработанных растений наблюдалась повышенная активность ПО, КАТ и СОД, а также низкая активность ПОЛ по сравнению с инвазированными необработанными растениями. Это позволяет поддерживать баланс между образованием и обезвреживанием АФК, и имеет значение не только в защите растительных тканей от окислительных процессов, но также и для сохранения гигантских клеток, питающих паразита. Представленные данные впервые показывают механизм действия Si–НЧ в развитии устойчивости и адаптации растений к биогенному стрессу, связанный с влиянием на различные компоненты антиоксидантной системы и их функциональным взаимодействием.

Ключевые слова: галловые нематоды, наночастицы кремния, индуцированная устойчивость, антиоксидантные ферменты, пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутазы, перекисное окисление липидов

DOI: 10.31857/S2686738922050304

Проблема повышения устойчивости растений (иммунного статуса) к фитопатогенам путем индукции природных защитных механизмов разрабатывается уже многие годы. Это направление особенно актуально в защите растений от нематод – опасных паразитов корневой системы, ущерб от которых исчисляется миллионами долларов, а эффективные способы борьбы отсутствуют. Индуцированную устойчивость (ИУ) вызывают факторы биотической и абиотической природы, названные индукторами или элиситорами, способные активизировать сложную интегрированную систему защитных механизмов и тем самым максимально реализовать естественный иммунный потенциал растений. Среди множества

индукторов биогенной и абиогенной природы, способных влиять на иммунный статус растений, научный и практический интерес представляют микроэлементы, особенно в наноразмерных формах. В последнее время большое внимание стало уделяться исследованию наночастиц кремния (Si–НЧ), которые обладают низкой токсичностью, антибактериальными свойствами и пролонгированным действием [1, 2]. Благодаря уникальным физическим и химическим свойствам, Si–НЧ могут легко проникать в клетки растений и вызывать морфологические и физиологические изменения, способствующие повышению устойчивости к болезням, вызванным грибами, бактериями и нематодами [3–5]. Механизм действия Si–НЧ практически не исследован. Немногочисленные данные свидетельствуют о его воздействии на генерацию активных форм кислорода (АФК) – раннюю реакцию клеток на стрессоры различной природы [6, 7].

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: zinovievas@mail.ru

АФК в клетках растений образуются в обычных условиях и принимают участие в метаболизме. Нарушение про- и антиоксидантного равновесия ведет к их избыточному накоплению, усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), повреждению макромолекул и гибели клетки. Растения обладают эффективными механизмами для противодействия АФК. Антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ) считаются основными ферментами, участвующими в удалении свободных радикалов и активных форм кислорода. Несмотря на то что интерес к изучению антиоксидантной системы защиты (АОС) уже многие годы не ослабевает, целый ряд особенностей ее функционирования, в частности, в условиях действия на растения биогенного стресса, вызванного паразитическими нематодами, остается до конца не выясненным. Имеющиеся в литературе данные об изменении окислительного гомеостаза, нарушенного нематодами, немногочисленны и достаточно противоречивы [8, 9]. Недостаточно полно изучена работа АОС у различных по нематодоустойчивости растений, хотя существует мнение, что устойчивые растения обладают более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с восприимчивыми [8]. Отсутствуют данные о динамике изменений различных компонентов антиоксидантной ферментной системы (КАТ, СОД, ПО), а также об их функциональном взаимодействии на различных этапах развития паразитов, которые необходимы для установления роли АФК в развитии взаимоотношений в системе нематода–растения. В последние годы становится понятно, что компоненты этой системы пребывают в сложном функциональном взаимодействии друг с другом, которое может быть аддитивным, синергическим и антагонистическим [10].

Цель работы – исследовать влияние препарата Si–НЧ на процесс ПОЛ и антиоксидантной системы защиты клеток, в растениях томатов *Lycopersicon esculentum* Mill при инвазии их галловой нематодой *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949, на протяжении развития нематод в корнях растений и тем самым показать возможную роль про/антиоксидантной системы растений в системной устойчивости растений к нематодам, опосредованной Si–НЧ.

Исследования проводили на восприимчивом к галловой нематоды гибриде томатов F1 Гамаюн (ИУ 30%). Семена поверхностно стерилизованных томатов перед посадкой в грунт замачивали в 2 мл 1.0 мкг/мл препарата Si–НЧ течение 2 ч. Через 3 нед после прорастания часть растений инвазировали нематодой (3000 личинок/растение) и опрыскивали растворами препарата в тех же концентрациях, которыми обрабатывали семена (10 мл/растение). Контрольные семена и расте-

ния обрабатывали водой. Контролем были здоровые растения. Растительные пробы для анализов отбирали на ключевых этапах жизнедеятельности нематоды: 1-е сутки – внедрение в корни, межклеточная миграция; 3-и сутки – прекращение миграции, индукция и формирование мест питания – гигантских клеток (клеток сосудистой системы корня, метаболизм которых был направленно изменен секреторной деятельностью личинок); 5–7-е сутки – потеря подвижности, питание, развитие; 20-е сутки – питание, формирование яйцевого мешка, откладка яиц, завершение жизненного цикла. Анализы проводили в 3-кратной повторности.

Для работы был использован препарат водного коллоидного раствора Si–НЧ, полученного методом лазерной абляции [11]. Средний размер частиц составлял 65.3 ± 1.6 нм, рН раствора – 4.92, дзета-потенциал равен 12.3 мВ, исходная концентрация – 10 мкг/мл. Работу проводили с препаратом в концентрации 1.0 мкг/мл, поскольку в этой концентрации проявлялось наибольшее индуцирование устойчивости томатов к галловой нематоды, что было установлено нами ранее [5].

Об уровне оксидативного стресса судили по содержанию малондиальдегида (МДА) – конечного продукта перекисного окисления липидов, которое определяли по образованию окрашенных комплексов с 2-тиобарбитуровой кислотой. Общее содержание белка определяли по методу Бредфорда [12].

Активность ферментов измеряли спектрофотометрически [12]: активность СОД (СОД, КФ.1.15.1.1) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия; активность ПО (ПО, КФ.1.11.1.7) – реакцией окисления бензидина; активность КАТ (КАТ, КФ.1.11.1.6) – по количеству разложенной перекиси водорода. Данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. На рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Полученные результаты показали, что в корнях томатов, которые не были обработаны Si–НЧ (контроль), в период межклеточной миграции и на этапе образования мест питания (1–3-и сутки после инвазии), активность ПОЛ была ниже, чем в здоровых растениях в пределах 20%. С переходом на седентарный образ жизни, в период активной жизнедеятельности и продуцирования яиц, содержание МДА было на уровне здоровых растений (рис. 1 а).

Активность ПО, СОД и КАТ в корнях контрольных растений (без обработки) на ранних стадиях паразитирования, связанных с проникновением и миграцией в корне, возрастала с максимумом на 3-и сутки (ПО в 2.9 раза, СОД в

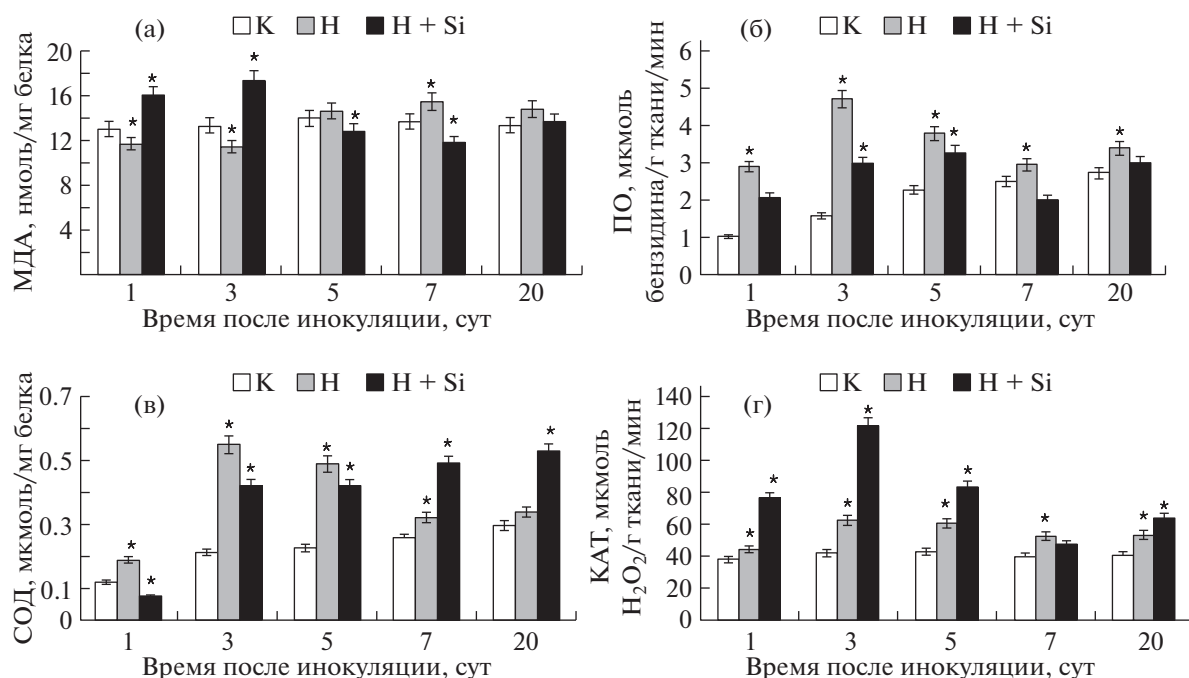


Рис. 1. Активность антиоксидантных ферментов в корнях здоровых растений томатов (К); при заражении галловой нематодой (Н); обработанных препаратом нанокремния (Н+Si) при заражении галловой нематодой. а – активность перекисного окисления липидов (содержание малондиальдегида – МДА); б – активность пероксидазы (ПО); в – активность супероксиддисмутазы (СОД); г – активность каталазы (КАТ). Данные по оси ординат – дни после инокуляции растений. $M \pm m$; $n = 3$; * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$).

2.6 раза, КАТ в 1.5 раза). Затем активность ферментов немного снизилась, но оставалась выше, чем в корнях здоровых растений (рис. 1 б, в, г).

Согласно нашим результатам, в корнях растений на протяжении всего периода развития нематод наблюдается повышенная активность антиоксидантных ферментов. Это позволяет поддерживать в активном состоянии защиту от окислительного стресса, о чем свидетельствует низкий уровень МДА – маркер оксидативного стресса. Таким образом, в восприимчивых растениях складываются благоприятные условия для формирования гигантских клеток, активного питания и успешного прохождения паразитом стадий жизненного цикла.

Обработка растений Si–НЧ вызвала изменение исследуемых показателей в корнях растений по сравнению с необработанными. Активность ПО и СОД корнях инвазированных растений, обработанных Si–НЧ, в первые 3 сут после инвазии (в период миграции и создания зоны питания – гигантских клеток) была значительно ниже (в 2–3 раза), чем в инвазированных без обработки (рис. 1 б, в). В этот же период уровень МДА в корнях был заметен выше (в 1.3–1.4 раза), чем в корнях необработанных растений (рис. 1 а). Низкая активность этих ферментов и повышенный уровень ПОЛ указывают на образование свободных радикалов (АФК), что может вызвать локальный

некроз в области внедрившихся личинок, ингибировать их жизнедеятельность, а также ограничить формирование гигантских клеток.

Как известно, количество свободных радикалов в клетке строго регулируется при участии КАТ как основного компонента антиоксидантной системы, которая, кроме этого, лимитирует продолжительность жизни АФК, предохраняя клетку от их вредоносного воздействия [13]. В первые три дня после инвазии активность КАТ была выше (в 1.7–1.8 раза), чем в корнях необработанных растений (рис. 1 г). Возможно, высокая активность КАТ на этапе, связанного с индукцией и образованием гигантских клеток, способствовала частичному обезвреживанию АФК, которые токсичны не только для патогена, но и для самого растения, и была направлена на сохранение функционирования клеток хозяина, нарушенного деятельностью АФК, образовавшихся в этот период.

Во время седентарной стадии, начиная с 5-х суток после инвазии, на этапах питания, развития и продуцирования яиц в корнях обработанных растений наблюдалась повышенная активность ПО, КАТ и СОД по сравнению с инвазированными необработанными растениями, а также низкая активность ПОЛ (рис. 1 а, б, в, г). Это позволяет поддерживать баланс между образованием и обезвреживанием АФК, и имеет значение не

только в защите растительных тканей от окислительных процессов, но также и для сохранения гигантских клеток, питающих паразита. Эти клетки, несмотря на возможное их ингибирование продуктами АФК на этапе их образования (низкий уровень активности СОД и ПО, повышенное содержание токсичных МДА), продолжают исполнять свою функцию, обеспечивая жизнедеятельность нематод и сохранность популяции в обработанных Si–НЧ растениях, хотя и в значительно меньших масштабах, как было показано нами ранее [5].

Следует отметить, что наблюдаемое изменение активности антиоксидантных ферментов на различных этапах жизненного цикла паразита может быть обусловлено не только реакцией растения-хозяина, но и вмешательством в этот процесс самих паразитов. Паразитические нематоды разработали сложную систему защиты от окислительного стресса, включающую антиоксидантные ферменты, выделяемые в апопласт растений, которые способны удалять из растения продукты АФК [14]. Показана высокая активность КАТ у мигрирующих личинок галловой нематоды; известно также, что галловые нематоды продуцируют и выделяют в апопласт по меньшей мере четыре эффектора, которые препятствуют образованию АФК. Недавно было сообщено о прямом взаимодействии лектина С-типа и КАТ, выделяемых личинками галловых нематод в апопласт, что указывает на возможную манипуляцию нематодой процессом образования АФК [15]. Возможно, обратимое изменение активности КАТ и других ферментов, наблюдаемое в корнях инвазированных растений, является результатом саморегуляции и адаптации партнеров, в зависимости от изменения условий существования, в том числе под воздействием Si–НЧ.

Полученные данные о действии Si–НЧ дополняют результаты ранее проведенных нами исследований. На системе томаты – галловая нематода *Meloidogyne incognita* было показано, что Si–НЧ стимулируют ростовые процессы растений, снижают зараженность корневой системы нематодами и оказывают ингибирующее влияние на морфо-физиологические показатели нематод. При этом было отмечено возрастание содержания фотосинтетических пигментов и ряда биогенных элементов в инвазированных растениях, свидетельствующих об улучшении их физиологического состояния [5].

Представленные результаты показали, что одним из механизмов действия нанокремния, позволяющего рассматривать его в качестве индуктора системной устойчивости томатов к галловой нематоды растений, является его влияние на активность компонентов АОС. Смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия, наблюда-

емое в растениях при действии Si–НЧ на ранних этапах паразитирования, может создать условия, неблагоприятные для жизнедеятельности нематод и их развития. Это подтверждается данными о нарушении репродуктивной функции нематод (снижение количества формируемых яиц и личинок с резко сниженной жизнеспособностью) при развитии на корнях обработанных растений, что в итоге приводит к снижению численности их популяции и является показателем устойчивости растений [5].

Безусловно, индуцирующее действие Si–НЧ основано на многих, еще неисследованных механизмах. Свойства Si–НЧ позволяют им непосредственно проникать в клетки растений и взаимодействовать с белками и другими биомолекулами. Такое прямое действие Si–НЧ может способствовать быстрой передаче клеточных сигналов и проявлять биологическую эффективность в отношении фитопатогенов (синтез низкомолекулярных соединений, обладающих биоцидными свойствами (фитоалексины, фенолы), активацию сигнальной системы растений и индукцию защитных белков). Исследование этих механизмов может открыть новые возможности как для регуляции устойчивости растений к стрессам, так и для предотвращения потерь при хранении урожая.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН д.т.н. Г.Э. Фолманису и к.т.н. М.А. Федотову за предоставленный для исследования препарат наноразмерного кремния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kandhol N., Singh V.P., Peralta-Videa J., et al.* Silica nanoparticles: the rising star in plant disease protection // *Trends Plant Sci.* 2022. V. 27. № 1. P. 7–9.
2. *Zellner W., Tubana B., Rodrigues R.A., et al.* Silicon's role in plant stress reduction and why this element is not used routinely for managing plant health // *Plant Dis.* 2021. V. 105. № 8. P. 2033–2049.
3. *Rajput V.D., Minkina T., Feizi, et al.* Effects of silicon and silicon-based nanoparticles on rhizosphere microbiome, plant stress and growth // *Biology* 2021. V. 10. 791.
4. *Wang L., Ning C., Pan T., et al.* Role of silica nanoparticles in abiotic and biotic stress tolerance in plants: A review // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23. 1947.
5. *Udalova Zh.V., Folmanis G.E., Fedotov M.A., et al.* Effects of silicon nanoparticles on photosynthetic pigments and biogenic elements in tomato plants infected with root-knot nematode *Meloidogyne incognita* // *Dokl. Bioch. Bioph.* 2020. V. 495. P. 329–333.
6. *Khan M.R., Siddiqui Z.A.* Use of silicon dioxide nanoparticles for the management of *Meloidogyne in-*

- cognita*, *Pectobacterium betavascularum* and *Rhizoctonia solani* disease complex of beetroot (*Beta vulgaris*) // Sci. Horticult. 2020. V. 265. 109211.
7. El-Shetehy M., Moradi A., Maceroni M., et al. Silica nanoparticles enhance disease resistance in *Arabidopsis* plants // Nat. Nanotechnol. 2021. V. 16 № 3. P. 344–353.
 8. Melillo M.T., Leonetti P., Bongiovanni M., et al. Modulation of ROS activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato/root-knot nematode interactions // New Phytol. 2006. 170. P. 501–512.
 9. Leonetti P., Molinari S. Epigenetic and metabolic changes in root-knot nematode-plant interactions // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. 7759.
 10. Колынаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. 2019. Киев: Логос, 2019. 277 с.
 11. Roldugin V.I., Fedotov M.A., Folmanis G.E., et al. Formation of aqueous colloidal solutions of selenium and silicon by laser ablation // Dokl. Phys. Chem. 2015. V. 463. № 1. P. 161–164.
 12. 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.
 13. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа. Гилем. 2001. 160 с. ISBN 5-75-01-0215-7.
 14. Jagdale S., Rao U., Giri A.P. Effectors of root-knot nematodes: an arsenal for successful parasitism // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. 800030.
 15. Zhao J., Sun Q., Quentin M., et al. A *Meloidogyne incognita* C-type lectin effector targets plant catalases to promote parasitism // New Phytol. 2021. V. 232. P. 2124–2137.

EFFECTS OF SILICON NANOPARTICLES ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN TOMATO ROOTS INVASED BY MELOIDOGYNE INCOGNITA (KOFOID ET WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949

Zh. V. Udalova^a and S. V. Zinovieva^{a,#}

^a A.N. Severtsov Institute of ecology and evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#] e-mail: zinovievas@mail.ru

Presented by Academician of the RAS D.S. Pavlov

The effect of silicon nanoparticles (1 µg/mL) on the activity of lipid peroxidation, peroxidase, superoxide dismutase, and catalase in tomato roots invaded by root-knot nematode *Meloidogyne incognita* was studied. It was shown that in the early stages of parasitism treated with Si-NPs, low activity of PO and SOD, as well as an increased level of lipid peroxidation, are observed, which indicates the formation of free radicals (ROS) that can inhibit of nematodes and also limit the formation of giant cells. During the sedentary stage, at the stages of nutrition, development, and eggs production, the roots of treated plants showed an increased activity of PO, CAT, and SOD, as well as a low activity of POL compared to infested untreated plants. This makes it possible to maintain a balance between the formation and neutralization of ROS, and is important not only in the protection of plant tissues from oxidative processes, but also in the preservation of giant cells that feed the parasite. The presented data for the first time show the mechanism of action of Si-NPs in the development of resistance and adaptation of plants to biogenic stress, associated with the effect on various components of the antioxidant system and their functional interaction.

Keywords: root-knot nematodes, silicon nanoparticles, induced resistance, antioxidant enzymes, peroxidase, catalase, superoxide dismutase, lipid peroxidation