EVALUAREA ROLULUI GENOTIPULUI ÎN RĂSPUNSUL ANTIOXIDATIV LA TOMATELE INFECTATE CU VIRUSURI

Mării Liliana¹, Andronic Larisa¹, Smerea Svetlana¹, Balașova Natalia²

¹Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, Republica Moldova,

²Instituția Federală de Stat Științifică Bugetară „Centrul Științific Federal pentru Legume”, Regiunea

Moscova, Federația Rusă

e-mail: liliana.marii@igfpp.md

Abstract

Studying the particularities of manifestation of defensive indicators – POX and PPO in case of infection with 2 types of viruses of different virus-host combinations (sensitive, tolerant, resistant) was performed in basis of analysis of variance. The obtained results denote a significant contribution of all analyzed factors in the variability of PPO and POX indices, the major contribution returning to the genotype, followed by viral infection, the type of viral infection with a variable dose of contribution depending on the applied matrix. The PPO index expressed a higher specificity of the genotype response depending on the virus applied compared to POX. At the same time, it was found that TAV had a higher contribution in the variability of POX and PPO, compared to TMV.

Key words: viral infection, tomatoes, analysis of variance, antioxidant response

Introducere

Relațiile plantelor cu patogenii includ un șir de reacții de răspuns, pentru a diminua efectele provocate de pătrunderea intrusului în organismul gazdă. Declanșarea mecanismelor de apărare în cazul interacțiunilor incompatibile duce la manifestarea răspunsului hipersenzitiv (RH) asociat cu localizarea infecției, iar interacțiunea compatibilă, se finalizează cu producerea infecției [1]. Stresul oxidativ și răspunsul antioxidant asociat cu interacțiunea plantă-virus sunt elemente primordiale în vederea producerii infecției sau limitării răspândirii ei. Enzimele defensive precum peroxidaza (POX) și polifenoloxidaza (PPO) sunt atribuite reacțiilor de răspuns ale plantelor la stres [2]. În cazul creșterii nivelului activității peroxidazei ca urmare a unei rezistențe sistemice induse, are loc sinteza rapidă a speciilor reactive de oxigen ce duc la moartea celulei și inhibă activitatea patogenului, totodată efectele și rolul POX pot fi foarte variate în funcție de combinația virus – gazdă [3]. Activitatea polifenoloxidazei este importantă la etapele incipiente ale reacției de răspuns a plantei, când are loc distrugerea integrității membranei celulare și are loc eliberarea compușilor fenolici. PPO catalizează oxidarea fenolilor astfel creând un mediu nefavorabil dezvoltării patogenilor [4].

Ameliorarea culturii tomatelor este distinsă de existența unor genotipuri cu gene de rezistență (Sw, Ty sau Tm) la câteva virusuri, inclusiv și VMT [5]. Trei gene asociate rezistenței la VMT, *Tm1*, *Tm2* și *Tm2²*, identificate în speciile spontane și introduse în specia de cultură au fost folosite și în cercetările actuale. Principiul de acțiune al genei *Tm-1* e legat de inhibarea replicării ARN-ului viral [6], iar a genelor *Tm2* și *Tm2²* de limitarea deplasării particulelor virale [7]. În studiile recente este dovedit efectul genei *Tm2²* împotriva mai multor tipuri de virusuri [8].

În cercetările prezente sunt reflectate aspecte ce țin de evaluarea contribuției unor factori prestabiliți, în manifestarea reacțiilor enzimactice defensive, POX și PPO, a genotipurilor de tomate la infectarea cu VMT sau VAT.

Materiale și metode

În calitate de material biologic au servit plantele a 5 genotipuri de tomate, cu diferit statut genetic și diferită reacție de răspuns la infectare cu VMT: sensibil – soiul Elvira, tolerant *S. pimpinellifolium*, rezistent - 3 genotipuri: Rufina (Tm-1/Tm-2²), Craigella (Tm-2²/Tm-2²) și Craigella (Tm-1/Tm-1).

Experiențele au fost realizate în condiții de solariu. Fiecare din cele 5 genotipuri, a fost reprezentat de 3 variante: martor, VMT sau VAT (excepție genotipul Rufina, care a fost infectat doar cu VAT). Lotul martor a reprezentat plante ce nu au fost supuse infectării, iar lotul virus – plante infectate. Plantele au

fost inoculate cu VAT și VMT la etapa de 4-6 frunzulițe. Manifestarea simptomelor specifice s-a atestat la cca 20 zile după inoculare. Prezența particulelor virale în plantele inoculate a fost confirmată prin intermediul procedurii de microscopie electronică prin contrastare negativă [9]. Au fost etichetate câte 3 plante de la care au fost colectate frunze din etajele superioare celor supuse inoculării, care au servit drept sursă pentru izolarea proteinelor și determinarea activității peroxidazei acide (POX) și a polifenoloxidazei (PPO) [10] cu ajutorul spectrofotometrului, în baza modificării dinamice a densității optice a soluțiilor. Experiențele au fost realizate în 3 repetiții biologice și 3 analitice.

Prelucrarea statistică a datelor a fost realizată cu ajutorul pachetului de programe Statgraphics Plus 5.1. În baza valorilor Sumei pătratelor din analiza varianței a fost calculată contribuția factorului (CF) în diferențele dintre valorile medii ale variantelor.

Rezultate și discuții

Variația indicilor activității antioxidative (POX, PPO) a tomatelor atestată în cazul acțiunii infecțiilor virale rezultă din particularitățile defensive ale sistemelor plantă-virus (compatibil-incompatibil) și de înșăși specificitatea reacțiilor enzimactice la stres. Includerea în schema de analiză concomitent a mai multor factori complică interpretarea rezultatului prin prisma unor indicatori statistici cu tendințe (creștere, diminuare), și semnificații neunivoce, după cum este parțial redat în figura 1. În acest scop a fost aplicată analiza varianței care permite să stabilim dacă există diferențe între valorile medii a mai multor variante sau grupuri analizate după același indice.

Figura 1. Valorile relative ale indicilor POX (A) și PPO (B) în variantele infectate cu VMT sau VAT raportate la marmor.

Analizele preventive au stabilit o dependență semnificativă a variației indicilor POX și PPO în funcție de genotip, prezența infecției virale și tipul virusului aplicat (Tabelul 1). Astfel, contribuția (CF) cea mai mare în variabilitate revine genotipului (32,5%) la analiza indicelui POX, iar pentru PPO acesta este devansat de tipul virusului aplicat – VMT sau VAT (29,8%).

Reieșind din cele menționate, precum și luând în calcul particularitățile acțiunii fiecărui tip de infecție virală asupra genotipurilor de tomate, particularitățile genotipurilor, dar și specificitatea de acțiune a reacțiilor antioxidative, s-a realizat analiza separată a indicilor POX și PPO pentru fiecare tip de infecție VMT și VAT, precum și alți factori cu diferite grade libertate determinați de schema experienței.

Tabelul 1. Analiza varianței POX și PPO în funcție de genotip, infecție virală și tipul infecției virale (VMT, VAT)

Sursa variației	SP	CF	GL	F	SP	CF	GL	F
POX					PPO			
Genotip	0,826663	32,5	4	22,85***	0,204391	24,0	4	20,44***
Infecție virală	0,221496	8,7	1	24,49***	0,103807	12,2	1	41,52***
Tipul virusului	0,191412	7,5	1	21,16***	0,253944	29,8	1	101,57***
total	2,54699		149		0,851506		155	

POX. Conform rezultatelor analizei varianței, constatăm că, la infectarea cu VMT sau VAT, atât genotipul, infecția virală, cât și interacțiunea lor au contribuții semnificative în variația POX și a diferențelor dintre valorile medii. Constatăm că, în cazul VAT variația POX a fost mai puternic influențată de prezența infecției comparativ cu VMT, respectiv 18,2 și 4,2% (Tabelul 2).

Tabelul 2. Analiza varianței POX în funcție de genotip, infecție virală și repetiția biologică la infectare cu VMT sau VAT

Sursa variației	SP	CF	GL	F	SP	CF	GL	F
VMT					VAT			
Genotip-A	0,231862	38,9	4	21,20***	0,453344	35,3	3	31,56***
Infecție virală-B	0,030167	5,1	1	11,03***	0,236135	18,4	1	49,31***
Repetiția	0,0049736	0,8	2	0,91	0,00982978	0,8	2	1,03
A x B	0,088382	14,8	4	8,3***	0,225729	17,6	3	15,71***
Total	0,596413		89		1,28535		68	

Răspunsul specific al genotipurilor la infectare cu virus a determinat și valori diferite ale contribuției infecției în funcție de virusul aplicat – VMT (5,1%) sau VAT (18,4 %). Nu s-au stabilit diferențe semnificative între valorile medii în cazul repetițiilor biologice.

Un răspuns diferențiat și semnificativ al indicilor POX a fost stabilit pentru factorul *tipul genotipului* - sensibil, tolerant și grupul cu *gene de rezistență* față de VMT, în cazul infectării cu VMT (interacțiuni compatibile și incompatibile) sau VAT (interacțiuni compatibile), devansând după contribuție aportul factorului infecția virală – 39,8% față de 15,2% (Tabelul 3).

Tabelul 3. Analiza varianței POX în funcție de tipul genotipului (sensibil, tolerant, rezistent) la infectare cu VMT sau VAT

Sursa variației	SP	CF	GL	F	SP	CF	GL	F
VMT					VAT			
Infecție virală	0,0607658	10,2	1	13,89***	0,195842	15,2	1	23,72***
Tipul genotipului	0,151262	25,4	2	17,29***	0,511375	39,8	2	30,97***
Total	0,596413		86		1,28535		68	

PPO. În mod similar algoritmilor expuși pentru POX au fost analizați factorii care contribuie la variația indicelui PPO. Analizând rezultatele obținute s-a constatat că, asupra indicilor PPO o contribuție semnificativă considerabilă o are genotipul, urmată de infecția virală și interacțiunea acestor factori, care au avut o conotație diferită în funcție de tipul infecției aplicate. Nu s-au stabilit diferențe statistice semnificative între valorile medii ale PPO pentru cele 3 repetiții biologice.

O particularitate relevantă este statutul genetic al genotipurilor analizate față de VMT (sensibil, tolerant și rezistent). Astfel, contribuția semnificativă în variabilitatea valorilor PPO în cazul infectării cu VMT în proporție de 72,9% a fost pe seama genotipului și doar 3,1% pe seama diferențelor între variate infectate și sănătoase – 3,1% (Tabelul 4). Totodată, în cazul infectării cu VAT a acelorași genotipuri s-a stabilit, de asemenea o contribuție semnificativă de 29,1% a genotipului în variabilitatea PPO, 32,8% a infecției virale și 28,2% a revenit interacțiunii factorilor menționați.

Tabelul 4. Analiza varianței PPO în funcție de genotip, infecția virală și repetiția biologică la infectare cu VMT sau VAT

Sursa variației	SP	CF	GL	F	SP	CF	GL	F
VMT					VAT			
Genotip A	0,229954	72,9	4	83,93***	0,109007	29,1	3	65,30***
Infecție virală B	0,009750	3,1	1	14,23***	0,122925	32,8	1	220,93***
Repetiția	0,0035738	1,1	1	2,61	0,003033	0,8	2	2,73
A x B	0,014705	4,7	4	5,37***	0,105756	28,2	3	63,36***
Total	0,315325		83		0,375219		71	

O confirmare suplimentară a răspunsului diferențiat în funcție de tipul infecției virale e reflectată și în Tabelul 5, în cazul în care s-a analizat separat fiecare tip de interacțiune VMT - genotip sensibil, tolerant și rezistent.

Luând în calcul că 3 din 5 genotipuri erau purtătoare de gene de rezistență față de VMT, există o contribuție semnificativă a infecției virale asupra variabilității PPO (4,6%, $P \leq 0,01$), dar mult mai mică comparativ cu VAT (32,8%), care se caracterizează printr-un grad mai mare de agresivitate asupra plantei, fapt ce rezultă și din figura 1B, unde sunt înregistrate valori ce depășesc de până la 1,6-3,2 ori mărtoarea la infectare cu VAT și maxim de 1,3 ori mai mult la infectare cu VMT. Totodată, tipul genotipului la

infecțare cu VMT a contribuit cu 43,6% în variabilitatea atestată, iar în cazul infectării cu VAT aceasta a fost determinată în proporție de 26,7%.

Tabelul 5. Analiza varianței PPO în funcție de tipul genotipului la infecțare cu VMT sau VAT

Sursa variației	SP	CF	GL	F	SP	CF	GL	F
VMT					VAT			
Infecție virală	0,014436	4,6	1	7,23**	0,122925	32,8	1	54,90***
Tipul genotipului	0,137419	43,6	2	34,39***	0,100046	26,7	2	22,34***
Total	0,315325		83		0,375219		71	

Concluzii

Drept rezultat al celor expuse, putem stabili că, genotipul are contribuție majoră în reacțiile defensive ale plantelor în cazul infectării virus. Totodată, răspunsul genotipului și contribuția lui în variabilitatea activității enzimelor POX și PPO depind și de alți factori, precum tipul virusului, statutul interacțiunii genotip-virus, iar acțiunea lor în complex determină în anumită măsură tendințe cumulative de amplificarea sau diminuare a variabilității.

Indicele PPO a exprimat o specificitate mai mare de răspuns a genotipului în funcție de virusul aplicat comparativ cu POX. Totodată, s-a constatat că, VAT a avut o contribuție mai mare în variabilitatea POX și PPO, comparativ cu VMT.

Cercetările au fost realizate în cadrul proiectului Programului de Stat 20.80009.7007.04 „Biotehnologii și procedee genetice de evaluare, conservare și valorificare a agrobiodiversității”, finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Bibliografie

- BALINT-KURTI, P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. In: *Mol Plant Pathol.* 2019. Vol. 20(8), p. 1163–1178.
- CLARKE, S., GUY, P., BURRITT, D., JAMESON, P. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. In: *Physiologia Plantarum.* 2002. Vol. 114(2), p. 157-164.
- HERNÁNDEZ, J., GULLNER, G., CLEMENTE-MORENO M., et al. Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 2016. Vol. 94, p. 134-148.
- TARANTO, F., PASQUALONE, A., MANGINI G., et al. Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. In: *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18 (377). doi:10.3390/ijms18020377.
- MARCHANT, W., GAUTAM, S., HUTTON, S., SRINIVASAN, R. Tomato yellow leaf curl virus-resistant and - susceptible tomato genotypes similarly impact the virus population genetics. In: *Front. in Plant Sci.* 2020. Vol.11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.599697>.
- ISHIBASHI, K., ISHIKAWA, M. The resistance protein Tm-1 inhibits formation of a tomato mosaic virus replication protein – host membrane protein complex. In: *Journal of Virology.* 2013. Vol. 87(14), p. 7933-7939.
- PANTHEE, D., BROWN, A., YOUSEF, G., et al. Novel molecular marker associated with Tm^{2a} gene conferring resistance to tomato mosaic virus in tomato. In: *Plant Breeding.* 2013. Vol. 132, p. 413-416.
- HU, Z., LIU, G., GAO, J., et al. Tomato Tm-2² gene confers multiple resistances to TMV, ToMV, PVX, and PVY to cultivated potato. In: *Russian Journal of Plant Physiology.* 2015. Vol. 62, p. 101–108.
- HITCHBORN, J.H., Hills G.I. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. In: *Virology.* 1965. Vol. 27, p. 528-540.
- ЕРМАКОВ, А.И., АРАСИМОВИЧ, В.В., ЯРОШ, Н.П. и др. *Методы биохимического исследования растений.* Л.: Агропромиздат. 1987. 430 с.