

УДК: 577.2.04

РАЗНОНАПРАВЛЕННОСТЬ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ БИОТИЧЕСКОМ И АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССАХ*

VARIOUS DIRECTIONS OF PROTECTIVE DEFENSE REACTION OF POTATOES AT BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES

А.И. Перфильева, Сибирский институт физиологии и биохимии растений, ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033, Россия; **Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет**, ул. Лермонтова, 83, Иркутск, 664074; Россия, тел. +7 (924) 607-05-33, +7 (964) 227-81-94, e-mail: alla.light@mail.ru

Е.В. Рымарева, Сибирский институт физиологии и биохимии растений, ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033, Россия

A. I. Perfilieva, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Lermontov st., 132, Irkutsk, 664033, Russia; **Irkutsk State Technical University**, Lermontov st., 83, Irkutsk, 664074, Russia, tel. +7 (924) 607-05-33, +7 (964) 227-81-94, e-mail: alla.light@mail.ru

E. V. Rymareva, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, 132 Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russia

В статье представлены результаты, подтверждающие предположение о наличии в растительном организме двух разнонаправленных защитных программ, реализуемых при биотическом (патогенез) и абиотическом (тепловом) стрессах. Активация защитных реакций на тепловой стресс может подавлять защитные реакции на биотическое воздействие.

Ключевые слова: картофель, тепловой стресс, биоинформационный анализ, белки теплового шока, PR-белки, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

The results confirming the assumption about existence in a plant organism of two multidirectional protective programs are presented in article, realized at biotic and abiotic (thermal) stresses. Activation of protective reactions to a thermal stress can suppress protective reactions to biotic influence.

Key words: potatoes, thermal stress, bioinformation analysis, heat shock proteins, PR- proteins, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

На сегодняшний день остаются не достаточно изученными механизмы, реализуемые в растительной клетке при воздействии на них стрессовых факторов различной природы. Существуют исследования, свидетельствующие об изменении метаболизма клетки при стрессе, что связывают с изменением концентраций молекул — вторичных мессенджеров, в частности, ионов кальция, активных форм кислорода и азота [4, 5, 6]. Имеется множество исследований, посвященных изучению влияния повышенной температуры на растения. При тепловом стрессе в клетке происходит синтез белков теплового шока (БТШ), которые защищают клетку от последствий высокотемпературного воздействия [5]. В ряде случаев БТШ индуцируются при вторжении патогенов в растения и при обработке элиситорами. Большинство исследований, связанных с патогенезом растений, ориентированы на изменение экспрессии генов PR-белков (pathogenesis-related proteins), защищающих клетку от последствий биотического стресса [7]. Однако крайне мало данных об изменении экспрессии генов при

одновременном воздействии теплового и биотического стрессоров на растения.

В настоящей работе представлены результаты исследования изменения экспрессии защитных генов при тепловом стрессе и патогенезе в растениях картофеля *in vitro* с применением биоинформационного анализа с использованием Банка данных AtGenExpress. В роли патогена в данной работе выбрана бактерия *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) — палочковидная бактерия, которая вызывает кольцевую гниль картофеля. Потери урожая от данного заболевания могут достигать 60% [3]. Изучение защитных реакций картофеля при патогенезе Cms является важным для понимания возможных механизмов повышения устойчивости картофеля к данному патогену.

В работе были использованы растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* сорта Луговской, который устойчив к кольцевой гнили, и сорта Лукьяновский, восприимчивый к этой болезни. Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляли по методике Бутенко [1].

* Авторы выражают благодарность за помощь в выполнении экспериментальных работ заведующему лабораторией фитоиммунологии Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН к.б.н. Е.Г. Рихванову, ведущему инженеру лаборатории физиологической генетики Т.М. Русаевой.

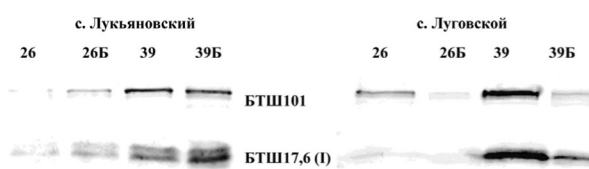
В работе использовали штамм грамположительной бактерии *Cms* Ас-1405. Бактериальную культуру выращивали на среде YPGA [2]. Для заражения растений картофеля *in vitro* в среду роста растений вносили 1 мл суспензии *Cms* (Титр = $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), избегая попадания бактерий на растение. Термическую обработку картофеля *in vitro* проводили в воздушном термостате при 39°C 2 ч (тепловой стресс). Выделение белка осуществляли по стандартной методике [8]. Количество белка определяли по методу Лоури [13]. Электрофорез в ПААГ проводили по модифицированной системе Лэммли [12], на приборе Mini-PRO-NEAN III Electrophoretic Cell фирмы Bio-Rad (США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, США) для Вестерн-блоттинга проводили в приборе Bio-Rad, (США). В работе использовали антитела кролика, полученные против БТШ101 (Agrisera As 07 253) и БТШ17,6 класс I (Agrisera As 07 255). Для анализа изменения экспрессии генов БТШ и генов PR-белков при тепловом стрессе (38°C, 15 мин., 30, 60 и 180 мин.) в побегах, корнях и культуре клеток арабидопсиса использовали данные Kilian et al. (2007) [10] с применением базы данных AtGenExpress (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>).

В некоторых случаях биотический стресс индуцирует экспрессию генов БТШ в растениях [9; 14]. Поэтому в следующих экспериментах было изучено влияние проникновения бактерий на синтез БТШ в растениях картофеля *in vitro*, а также на изменение способности зараженных растений индуцировать синтез БТШ в ответ на тепловой стресс. Для этого растения картофеля *in vitro* заражали *Cms*, как это описано выше, и после двух суток инкубации при 26°C подвергали тепловому стрессу 39°C, 2 ч, анализировали изменение в уровне синтеза БТШ101 и БТШ17,6. Роль БТШ17,6 заключается в предотвращении денатурации и агрегации белков клетки с помощью гидрофобных взаимодействий с ними, а роль БТШ101 — в препятствии агрегации белков клетки, а также в удалении неправильно свернутых белков [6].

В контрольных растениях, не подверженных действию теплового стресса и заражения, синтез исследуемых белков был незначительным. Тепловая обработка при 39°C заметно индуцировала синтез БТШ101 и БТШ17,6 (рис.). Заражение *Cms* растений картофеля *in vitro* различным образом влияло на индукцию синтеза БТШ в растениях восприимчивого и устойчивого сортов. В зараженных растениях сорта Лукьяновский происходила индукция синтеза БТШ, а в растениях сорта Луговской синтез БТШ подавлялся. Согласно литературным данным, обработка бактериальным элиситором Харпином суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* приводила к активации экспрессии ряда генов БТШ. Активация экспрессии имела временный характер, она отмечалась через 30 мин. после обработки, а через 4 ч, наоборот, экспрессия снижалась ниже контрольного уровня [11]. Возможно, аналогичное явление наблюдается и в растениях картофеля *in vitro* при заражении *Cms*, а динамика изменения уровня БТШ имеет различный характер у устойчивого и восприимчивого сортов. Способность предварительно зараженных растений синтезировать БТШ в ответ на тепловой стресс также имела сортовую специфику. Зараженные растения устойчивого сорта синтезировали БТШ при тепловом стрессе 39°C в меньшем количестве, чем зараженные растения восприимчивого сорта (рис.).

Литература

- Бутенко Р.Г., Хромова Л.М., Седина Г.Г. Методические указания по получению вариантных клеточных линий и растений у разных сортов картофеля — М.: ВАСХНИЛ, 1984. — 28 с.
- Иванова Н.Г. Разработка селективного фактора для проведения клеточной селекции на устойчивость к *Corynebacterium sepedonicum*. Использование клеточных технологий в селекции картофеля // Науч. труды, 1987. — С. 26—28.
- Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков — Мн.: Беллпринт, 2005. — 696 с.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. Ответ на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология, 2009. — №16. — С. 19—38.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Киев: Основа, 2010. — 352 с.
- Косаковская И.В. Стрессовые белки растений / Киев: Институт ботаники, 2008. — 154 с.
- Малиновский В.И. Механизмы устойчивости растений к вирусам / Владивосток: Дальнаука, 2010. — 324 с.



Синтез БТШ в картофеле *in vitro*.

26 — контрольные растения; 26Б — растения, инокулированные *Cms* (штамм Ас-1405); 39 — растения, обработанные при 39°C (2 ч); 39Б — растения, инокулированные *Cms* и обработанные при 39°C (2 ч). Растения картофеля *in vitro* (сорт Лукьяновский и сорт Луговской) инокулировали *Cms*. Спустя 2 сут. коинкубации растения обрабатывали при 39°C (2 ч) и определяли содержание БТШ. Представлены данные типичного эксперимента, n=4.

Подавление индукции синтеза БТШ у зараженных растений устойчивого сорта позволило предположить, что активация защитной программы в ответ на тепловой стресс находится в обратной зависимости к активации защитной программы в ответ на биотическое воздействие.

В ответ на биотический стресс, синтезируются PR-белки, которые защищают клетки растений от его последствий [7]. Биоинформационный анализ экспрессии генов арабидопсиса в ответ на тепловой стресс, проведенный с использованием базы данных AtGenExpress на основе результатов Kilian et al. (2007) [10], показал, что активация экспрессии генов БТШ при тепловом стрессе, как правило, сопровождается подавлением экспрессии генов PR-белков. Этот результат подтверждает предположение, что в условиях, когда развивается устойчивость к тепловому шоку, устойчивость к биотическому стрессу снижается. Биотическое или тепловое воздействие воспринимается рецептором на плазмалемме растительной клетки, при этом происходит повышение уровня кальция в цитозоле [4]. Это событие приводит к активации митохондриальной продукции АФК. Повышение уровня кальция и продукция АФК оказывают влияние на экспрессию генов. Так, при тепловом воздействии происходит синтез БТШ, а при биотическом стрессе — синтез PR-белков. По-видимому, сигнатура изменения уровня кальция и АФК при тепловом стрессе и патогенезе различна. При одновременном наложении биотического и абиотического стрессоров на растение происходит сдвиг изменений концентрации «сигнальных» молекул, что приводит к подавлению одной защитной программы другой.

Сортные различия зараженных растений картофеля в синтезе БТШ при тепловом стрессе могут быть объяснены различной скоростью в процессе распознавания патогена. В то время как в клетках растений устойчивого сорта происходит синтез PR-белков в ответ на взаимодействие с патогеном и уменьшается количество свободных аминокислот, в клетках восприимчивого сорта процесс распознавания патогена замедлен, поэтому все свободные аминокислоты расходуются на синтез БТШ. Подобная реакция (рис.) наблюдалась спустя 0,5 ч после окончания тепловой обработки растений. Возможно, во временной динамике баланс защитных белков у восприимчивого сорта может смещаться в сторону PR-белков, что требует дальнейшего исследования. ■

8. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / М.: ООО НПК ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ, 2004. — 98 с.
9. Duan Y.H., Guo J., Ding K., Wang S.J., Zhang H., Dai X.W., Chen Y.Y., Govers F., Huang L.L., Kang Z.S. Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses // *Mol Biol Rep.*, 2011. — V. 38, № 1. — P. 301—307.
10. Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J., Harter K. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses // *Plant J.*, 2007. — V. 50, № 2. — P. 347—363.
11. Krause M., Durner J. Harpin inactivates mitochondria in Arabidopsis suspension cells // *Mol Plant Microbe Interact.*, 2004. — V. 17, № 2. — P. 131—139.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4 // *Nature.*, 1970. — V. 227, № 5259. — P. 680—685.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*, 1957. — V. 193. — P. 265—275.
14. Maimbo M., Ohnishi K., Hikichi Y., Yoshioka H., Kiba A. Induction of a small heat shock protein and its functional roles in Nicotiana plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum* // *Plant Physiol.*, 2007. — V. 145, № 4. — P. 1588—1599.