



УДК 635.21:632.4:581.19

Действие возбудителя кольцевой гнили картофеля на суспензионные культуры клеток табака и картофеля

Ю. В. Омеличкина, Т. Н. Шафикова, Е. Г. Рихванов, А. Г. Еникеев, А. С. Романенко

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

E-mail: micrologus@gmail.com

Аннотация. *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (Cms) – фитопатоген, вызывающий кольцевую гниль клубней у единственного природного хозяина – картофеля. У табака, растения, не являющегося хозяином для этого патогена, Cms индуцирует реакцию сверхчувствительности. Суспензионные культуры табака и картофеля, подверженные слабому тепловому шоку, были инокулированы Cms. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предварительный тепловой шок может индуцировать устойчивость растения к последующему заражению патогеном.

Ключевые слова: кольцевая гниль, картофель, табак, патоген, реакция сверхчувствительности, некроз, тепловой шок.

Кольцевая гниль картофеля – системное заболевание, являющееся одним из наиболее распространенных и вредоносных бактериозов. Заболевание встречается в 31 стране на 5 континентах [8]. Вредоносность этого заболевания напрямую связана с наличием латентных форм инфекции, что крайне затрудняет диагностику заболевания и отбраковку зараженных растений.

Возбудителем заболевания является *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (Cms) – грамположительная бактерия, поражающая сосуды растения и распространяющаяся главным образом в них. Из-за задержки водоснабжения происходит угнетение роста картофеля. Проявление типичных симптомов заболевания сильно зависит от условий среды, штамма патогена и сорта картофеля. Скрытые инфекции обычно могут длиться на протяжении трех генераций, сохраняясь в поле или на тканях картофеля [1].

Возбудитель кольцевой гнили по своей патогенности является высоко специализированным; единственным известным природным хозяином является картофель *Solanum tuberosum*. В исследованиях часто применяют растения, не являющиеся хозяином для Cms, чаще всего это табак *Nicotiana tabacum*. На заражение Cms это растение отвечает реакцией сверхчувствительности – СЧ-реакцией [7].

Сверхчувствительный ответ – это быстрая гибель клеток в центре и вблизи участка инфекции в результате запуска определенной генетической программы, направленной на самоуничтожение растительной клетки. Реакция сверх-

чувствительности, наряду с апоптозом у животных, относится к программируемой клеточной смерти (ПКС). Как известно, апоптоз, наряду с биотическими, вызывают и абиотические факторы, например, воздействие повышенной температуры. Таким образом, можно говорить, что при воздействии факторов различной природы задействуются механизмы, перекрывающиеся в некой общей точке.

В то же время известно, что у всех изученных к настоящему времени организмов предварительное мягкое тепловое воздействие, которое само по себе не вызывает повреждений, индуцирует в клетке устойчивость к последующему более жесткому тепловому шоку, сопровождающуюся индукцией синтеза белков теплового шока (БТШ) [9; 4]. Это явление получило название индуцированная, или приобретенная, термотолерантность. Учитывая эти наблюдения, интересно было бы проверить, индуцирует ли предварительное мягкое тепловое воздействие устойчивость растения к последующему поражению патогеном.

Целью данной работы является изучение взаимодействия возбудителя кольцевой гнили картофеля с растительными организмами и влияния тепловой обработки на развитие инфекции.

Материал и методы

Растения инокулировали суспензией штамма С1С 31 *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, культивируемой при 26 °С в жидкой среде С [5].

Были использованы суспензионные культуры растительных клеток: табака *N. tabacum*; картофеля *S. tuberosum* (сорт Жуковский ранний); арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (Columbia). Суспензионные культуры растительных клеток культивировали при 26 °С на качалке на средах по Мурасиге и Скугу [6].

Применяли метод совместного культивирования – растительную суспензионную культуру инокулировали бактериальной суспензией, и в течение определенного времени культивировали при 26 °С на качалке. Жизнеспособность растительных клеток определяли по восстановлению 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ) до формазана [3].

Для изучения реакций растений на вторжение патогена использовали растения табака *N. tabacum* и картофеля *S. tuberosum*, культивируемые *in vivo*, *in vitro*. Был применен метод инокуляции листьев стерильных растений бактериальной суспензией. Для обнаружения деградации ДНК при развитии СЧ реакции применялся метод выделения ДНК из клеток растительной суспензионной культуры Дорохова Д. Б. [2] и горизонтальный электрофорез в 1,5%-ном агарозном геле. Для изучения морфологических параметров клеток суспензионной культуры табака при совместном культивировании с *Sms* использовали методы световой микроскопии.

Результаты и обсуждение

Растения табака и картофеля по разному реагируют на инокуляцию бактериальной суспензии в листья. При инокуляции суспензии вирулентных штаммов *Sms* в листья табака наблюдалась быстрая локализованная гибель клеток, характерная для реакции СЧ (рис. 1), а у картофеля, единственного известного природ-



Рис. 1. Реакция СЧ на листьях табака, вызванная инокуляцией *Sms* (штамм С1С31)

ного хозяина *Sms*, такой реакции не наблюдалось. Гибель клеток суспензионных культур табака, картофеля, арабидопсиса, инокулированных *Sms*, регистрировалась в разные сроки (см. табл.).

Гибель клеток суспензионной культуры табака, инокулированной *Sms*, регистрировалась уже после 24 часов совместного культивирования. Предположение, что клетки табака гибнут при возникновении СЧ-реакции, косвенно подтверждается данными световой микроскопии. При заражении культуры табака *Sms* в клетках наблюдается отставание протопласта от клеточной стенки, характерное для начальных стадий ПКС (рис. 2, показано стрелкой).

Клетки суспензионной культуры картофеля при совместном культивировании с *Sms* гибли уже в первые сутки после инокуляции. Учитывая, что инокуляция суспензии *Sms* в листья растений картофеля не приводила к возникновению локальной гибели клеток, можно полагать, что гибель клеток суспензионной культуры картофеля при совместном культивировании с *Sms* развивается по другим механизмам, нежели в случае суспензионной культуры клеток табака.

Таблица

Выживаемость клеток растительных суспензионных культур при совместном ко-культивировании с возбудителем кольцевой гнили картофеля

Исследуемая культура	Время после инокуляции, ч	Оптическая плотность (у.е./г сырого веса)			
		0	24	48	72
Табак	Контроль *	5,00±0,72	4,23±0,86	4,32±0,72	3,79±0,89
	Опыт **		1,01± 0,74	0,42±0,50	0,00
Картофель	Контроль	10,40±0,40	7,90 ±1,18	10,60±1,50	10,85±0,33
	Опыт		1,97±1,19	0,27±0,13	0,00
Арабидопсис	Контроль	22,22±1,38	20,12±1,20	23,81±3,08	17,59±1,31
	Опыт		20,39±1,04	21,59±0,50	6,31±1,99

Примечание: * – инокуляция исследуемой растительной культуры стерильной средой С, ** – инокуляция исследуемой растительной культуры *Sms* (штамм С1С31)

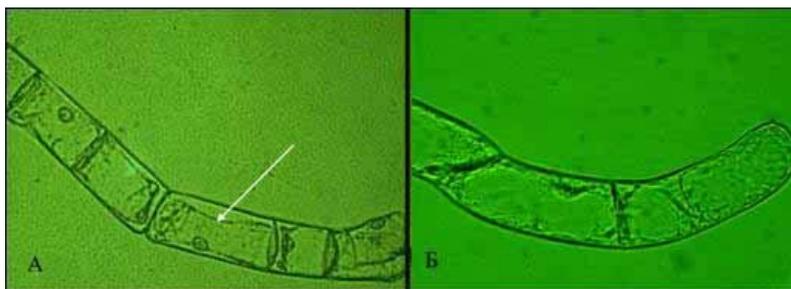


Рис. 2. Световая микроскопия клеток суспензионной культуры табака. А – клетки табака при ко-культивировании с Sms (штамм C1C31), Б – клетки табака в контроле (увеличение 40×10)

Гибель же клеток суспензионной культуры арабидопсиса была отмечена лишь по истечении 72 часов после инокуляции бактериальной суспензией, и вызывается, предположительно, истощением питательной среды.

Опыт по выявлению фрагментации ДНК, характерной для развития программируемой клеточной гибели, дал следующие результаты: для табака, зараженного Sms, наблюдается слабая деградация ДНК, характерная для ранних стадий СЧ-реакции.

Для проверки выдвинутого ранее предположения о том, что предварительная мягкая тепловая обработка может индуцировать устойчивость к последующему биотическому стрессу, растительные суспензионные культуры клеток инкубировали в течение двух часов при 37 °С, затем инокулировали суспензией Sms. Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки суспензионных культур, как табака, так и картофеля, зараженных Sms, при предварительной тепловой обработке более устойчивы к

заражению данным патогеном, чем клетки без тепловой обработки (рис. 3).

Выводы

Согласно полученным данным можно сделать следующие выводы:

1. Действие возбудителя кольцевой гнили картофеля на растительные организмы специфично: у картофеля, как растения-хозяина, Sms вызывает гибель клеток в результате развития заболевания; у табака, как растения-нехозяина, – в результате развития СЧ-реакции; у арабидопсиса гибели клеток не вызывает.

2. Развитие СЧ-реакции подтверждено обнаружением отлипания протопласта от клеточной стенки и ДНК-ладдеринга у гибнущих клеток.

3. Растительные клетки суспензионных культур при предварительной мягкой тепловой обработке менее восприимчивы к заражению патогеном, чем культуры без соответствующей обработки.

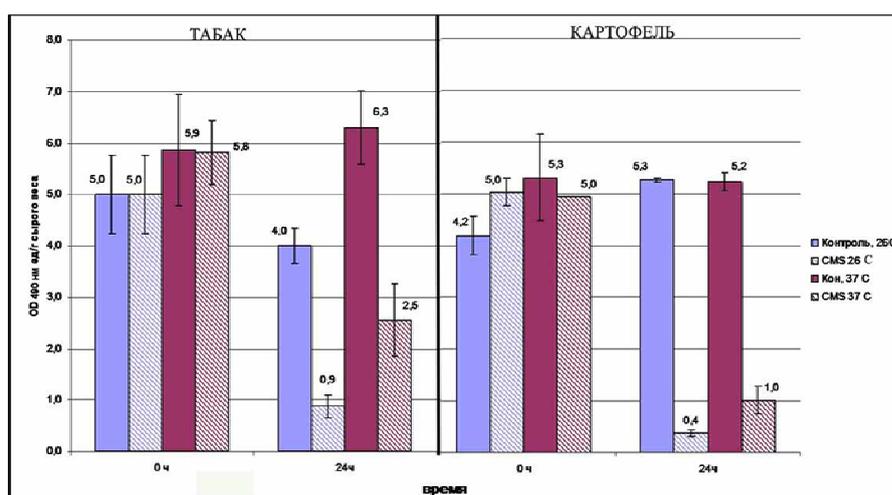


Рис. 3. Временная динамика снижения восстановления ТТХ культурами табака и картофеля, подвергнутыми предварительной тепловой обработке – 37 °С, и не подвергнутыми тепловой обработке – 26 °С, при совместном культивировании с Sms

Литература

1. Бактериальные болезни растений / под ред. проф. В. И. Израильского. – М.: Сельхозгиз., 1960. – 467 с.
2. Дорохов Д. Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–445.
3. Еникеев А. Г., Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток / А. Г. Еникеев, Е. Ф. Высоцкая, Л. А. Леонова и др. // Физиология растений. – 1995. – № 42 (3). – С. 423–426.
4. Рихванов Е. Г. Функции Hsp104p в развитии индуцированной термотолерантности и прионном наследовании у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Е. Г. Рихванов, В. К. Войников // Успехи современной биологии. – 2005. – Т. 125. – С. 115–128.
5. Meletzus D., Transformation of the Phytopathogenic Bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by Electroporation and Development of a Cloning Vector / D. Meletzus, R. Eichenlaub // Journal of Bacteriology. – 1991. – № 173(1). – P. 184–190.
6. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, Skoog, F. // Physiol. Plant. – 1962. – № 15. – P. 473–497.
7. Nissinen R. In planta – complementation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* strains deficient in cellulose production or induction restores virulence / R. Nissinen, S. Kassuwi, R. Peltola, M. Metzler // European Journal of Plant Pathology. – 2001. – № 107. – P. 175–182.
8. Stead D. E. A Review of the Risks and Yield Losses Caused by the Potato Ring Rot Pathogen, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / D. E. Stead, J. Wilson // Harpenden, United Kingdom, Internal Report CSL. – 1996. – 9 p.
9. Sung D. Y. Acquired Tolerance to Temperature Extremes / D. Y. Sung, F. Kaplan, K. J. Lee, C. L. Guy // Trends Plant Sci. – 2003. – Vol. 8, № 4. – P. 179–187.

Effect of causal agent of Potato Ring Rot on potato and tobacco suspension cultured cells

J. V. Omelichkina, T. N. Shafikova, E. G. Rihvanov, A. G. Enikeev, A. S. Romanenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

Abstract. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) is a phytopathogenic bacterium, which causes the Potato Ring Rot. In tobacco plants Cms induces a hypersensitive response – Plant defense responses upon pathogen attack. Potato and tobacco suspension cultures subjected to a light heat stress were inoculated with Cms. Our present results suggest that pretreatment with light heat stress may to induce plant resistance of further biotic stress.

Key words: Potato Ring Rot, tobacco, pathogen, hypersensitive response, necrosis, heat stress.

Омеличкина Юлия Викторовна
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова 132, а/я 1243
аспирант лаборатории фитоиimmunологии
тел. (395 2) 42–50–09, факс (395 2) 51–07–54
E-mail: micrologus@gmail.com

Omelichkina Yulia Viktorovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
doctoral student, Laboratory of Phytoimmunology
phone: (395 2) 42–50–09, fax: (395 2) 51–07–54
E-mail: micrologus@gmail.com

Шафикова Татьяна Николаевна
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова 132, а/я 1243
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории фитоиimmunологии
тел. (395 2) 42–50–09, факс (395 2) 51–07–54

Shafikova Tatyana Nikolaevna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph.D. in Biology, senior research scientist,
Laboratory of Phytoimmunology
phone: (395 2) 42–50–09, fax: (395 2) 51–07–54

Рихванов Евгений Геннадьевич
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова 132, а/я 1243
кандидат биологических наук, зав. лабораторией
фитоиimmunологии
тел. (395 2) 42–50–09, факс (395 2) 51–07–54

Rihvanov Evgeni Gennadyevitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph.D. in Biology, Head of Laboratory
of Phytoimmunology
phone: (395 2) 42–50–09, fax: (395 2) 51–07–54

Еникеев Андрей Густавович
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова 132, а/я 1243
кандидат биологических наук
зав. лабораторией трансгенных растений
тел. (395 2) 42-50-09, факс (395 2) 51-07-54

Enikeev Andrey Gustavovitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph.D. in Biology
Head of Laboratory of Transgenic Plants
phone: (395 2) 42-50-09, fax: (395 2) 51-07-54

Романенко Анатолий Сидорович
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова 132, а/я 1243
доктор биологических наук, гл. научный сотрудник
лаборатории фитоиimmunологии
тел. (395 2) 42-50-09, факс (395 2) 51-07-54

Romanenko Anatoli Sidorovitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
D.Sc. in Biology, principal research scientist,
Laboratory of Phytoimmunology
phone: (395 2) 42-50-09, fax: (395 2) 51-07-54