



УДК 581.1

Белки теплового шока картофеля *in vitro* при патогенезе кольцевой гнили

А. И. Перфильева¹, А. Г. Павлова², Б. Б. Бухьянова²

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: alla.light@mail.ru

Аннотация. Исследовали содержание белков теплового шока (БТШ) в тканях картофеля двух сортов (Луговской и Лукьяновский) при заражении возбудителем кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* и тепловой обработке различной интенсивности. В контрольных вариантах у растений обоих сортов синтез БТШ101 и БТШ17,6 был ярко выражен. Способность заражённых растений синтезировать БТШ в ответ на тепловой стресс не имела сортовой специфики. Тепловая обработка при 39 °С индуцировала синтез БТШ в тканях картофеля обоих сортов. Заражение незначительно индуцировало синтез БТШ в растениях сорта Лукьяновский, при этом у сорта Луговской наличия БТШ не наблюдалось, что может быть объяснено различной динамикой изменения уровня БТШ у сортов. Высокое содержание БТШ наблюдалось в тканях картофеля спустя 2-е сут. после теплового воздействия. Заражение растений сорта Луговской после теплового стресса снижало их способность синтезировать БТШ60 и БТШ17,6 по сравнению с неинфицированными растениями, подвергнутыми термообработке. Однако наблюдалось повышение содержания БТШ101 в тканях заражённых и термообработанных растений по сравнению с таковым у неинфицированных и подвергнутых термообработке растений.

Ключевые слова: глобальное потепление, белки теплового шока, PR-белки, патогенез, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Введение

Растения, как и прочие живые существа, подвергаются влиянию различных стрессовых воздействий абиотической и биотической природы. Для поддержания гомеостаза и адаптации к стрессу в организме растения происходит перераспределение питательных веществ и энергии между процессами роста, развития и защитными реакциями на стресс [38]. Среди защитных белков растений наиболее значимыми являются белки теплового шока (БТШ, или Hsp) и PR-белки.

БТШ синтезируются в ответ на повышение температуры и защищают растения от повреждающего действия экстремально высоких температур. БТШ выполняют функцию молекулярных шаперонов, препятствуют денатурации и агрегации белков, способствуют восстановлению их активности после теплового воздействия [35; 52]. БТШ обеспечивают временное связы-

вание и облегчение фолдинга незрелых пептидов в процессе трансляции, разборке олигомерных белковых комплексов, контроль биологической активности регуляторных белков (в том числе транскрипционных факторов), облегчение транспорта белков через мембраны растительной клетки, предотвращают агрегацию частично денатурированных белков вследствие межмолекулярных взаимодействий [49]. Ведущую роль в развитии термотолерантности у растений играет Hsp101 [43]. Известно, что БТШ синтезируются не только в ответ на воздействие высокой температуры, но и в ответ на широкий диапазон стрессовых факторов, например, в результате засоления, обезвоживания [28; 52]. В ряде случаев повышение интенсивности синтеза БТШ наблюдается и при биотическом стрессе [23; 29; 31].

При биотическом стрессе в клетках растений синтезируются защищающие клетку от его последствий патоген-зависимые белки (PR-белки), биотического стресса [5]. PR-белки – экстраклеточные белки, синтезируемые в растительной клетке при атаке патогеном, их роль при патогенезе значительна и разнообразна. Они являются участниками сигнальных систем (липооксигеназной, NO-сингазной), катализируют образование мессенджеров (салициловая, жасмоновая и абсцизовая кислота, этилен), являются антимикробными компонентами, укрепляют клеточные стенки растения (пероксидаза, каллоза) и способны вызывать повреждения клеточных стенок и цитоплазматических мембран патогенов [11]. PR-белки реализуют механизм защиты клеток, связанный с повышением образования АФК в растительной клетке. Показано, что многие PR-белки обладают фунгицидной и бактерицидной активностью *in vivo* [12; 48; 51].

Несмотря на то, что в ряде случаев повышение экспрессии БТШ может наблюдаться при биотическом стрессе [23; 29; 31], профили глобальной экспрессии генов в ответ на биотический и тепловой стресс у *Arabidopsis thaliana* существенно различаются [47]. В то же время, по-видимому, активация экспрессии генов PR-белков при биотическом стрессе и генов БТШ при тепловом стрессе имеет общие механизмы регуляции. Известно, что генерация активных форм кислорода (АФК) и кратковременное повышение содержания кальция в цитозоле растений наблюдается как при повышении температуры [40; 41], так и при вторжении патогенных организмов [19; 21; 25; 33; 37]. Эти процессы взаимосвязаны и контролируются митохондриями. Предположительно, при патогенезе экспрессия PR-генов также связана с митохондриями [53]. Вероятно, при одновременном наложении двух этих факторов (теплового стресса и патогенеза), которое часто встречается в естественных климатических условиях обитания растений, именно в митохондриях будет определяться «сценарий» развития защитных реакций клетки. По-видимому, специфичность адаптивной реакции на различные стрессовые воздействия достигается в результате строго определённой пространственной и временной динамики изменения уровня АФК и уровня кальция в цитозоле [6; 8; 9; 44]. Очевидно, клетка использует определенный язык внутриклеточного сигналинга для активации экспрессии одних и подавления других генов при каждом стрессовом воздействии, а какие-либо изме-

нения в этом языке могут отрицательно влиять на протекание тех или иных защитных реакций. Действительно, предварительное тепловое воздействие при 50 °С в течение 60 с приводило к усилению генерации АФК в растениях ячменя, но при этом снижалась его устойчивость к заражению патогеном *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [27].

Наличие защитных белков в клетке чрезвычайно актуально в современных климатических условиях. Известно, что за последние 50 лет на планете наблюдается глобальное потепление в виде повышения среднегодовой температуры [1; 4]. Можно предположить, что в зависимости от интенсивности теплового воздействия защитные системы растения-хозяина, связанные с вторжением патогена, либо активируются, либо подавляются. Изучение этого вопроса имеет огромное значение, если принять во внимание глобальный рост среднегодовой температуры, который, вероятно, способен привести как к распространению самих патогенов, так и повысить эффективность их проникновения в растение-хозяина [16]. Таким образом, проблема повышения устойчивости растений при тепловом воздействии весьма многогранна и актуальна для исследования.

В литературе показано, что увеличение среднегодовой температуры способствуют выживанию болезнетворных микроорганизмов зимой, ускоряет их жизненный цикл летом [18; 34]. Ожидается, что ареал обитания патогенных микроорганизмов будет расширяться в Европе [22; 39]. Высокие температуры сами по себе могут привести к катастрофическим потерям урожая [20]. Предполагается, что из-за повышения температуры на 2-3 °С произойдёт падение урожайности сельскохозяйственных культур в Африке, Азии, Индии и на Ближнем Востоке до 35 % [17]. Предлагается даже использовать степень распространения заболеваний растений как индикатор изменения климата [16; 32].

В то же время имеющиеся в литературе данные о влиянии теплового воздействия на биотический стресс крайне противоречивы. В одних случаях предварительная тепловая обработка приводила к повышению восприимчивости растений к инфекции. Например, повышение температуры подавляло защитные реакции проростков *A. thaliana* при взаимодействии с бактериальным патогеном *Pseudomonas syringae* [13]. Повышение температуры выращивания подавляло реакцию сверхчувствительности (СЧ) и усиливало проникновение вируса табачной мозаики в растения табака [45]. Предварительное тепловое воздействие при 36 °С в течение 30–120 мин усиливало заражение ячменя мучнистой росой [42] и патогеном *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [27]. Кратковременная тепловая обработка при 44 °С повышала восприимчивость сои к поражению фитофторой [46]. Аналогичная ситуация наблюдалась при заражении *Coffe arabica* L. патогенами *Colletotrichum kahawae* и *C. gloeosporioides*. Причём развитие восприимчивости в этом случае коррелировало с подавлением синтеза PR-белков и индукцией синтеза белка теплового шока HSP70 [15]. Напротив, тепловая обработка при 50 °С в течение 30–60 с подавляла заражение проростков ячменя мучнистой росой (гриб *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). При этом развитие устойчивости

не коррелировало с экспрессией PR-белков [42]. Аналогичным образом тепловая обработка растений картофеля при 40 °С в течение 48 ч ингибировала заражение картофеля мучнистой росой [23].

Одной из наиболее широко возделываемых культур в мире и в нашей стране является картофель. На сегодняшний день широко распространены различные заболевания картофеля, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями [3]. К заболеваниям, наносящим максимальный вред урожаю картофеля, в частности, в Иркутской области, следует отнести фитофтороз, чёрную ножку, альтернариоз, ризоктониоз. До 50 % урожая картофеля в странах Северной Европы и Канады теряется в результате заболевания кольцевой гнилью картофеля, которая вызывается грамположительной бактерией – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*). В России *Cms* не является карантинным организмом. Тем не менее, согласно данным Европейской и Средиземноморской организации защиты растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO), кольцевая гниль широко распространена в европейских регионах России. Потери урожая от заражения *Cms* могут составлять до 30 %. Основными факторами патогенности *Cms* являются ферменты целлюлаза и сериновая протеаза [24]. На сегодняшний день не существует доступных, эффективных и экологически безопасных способов борьбы с кольцевой гнилью. Мероприятия по ограничению распространения *Cms* сводятся к обеззараживанию инвентаря, сертификации посадочной продукции и механическому удалению больных растений [26].

Возникает вопрос, как наблюдаемое потепление климата скажется на поражаемости картофеля кольцевой гнилью в России? Имеющиеся по этому поводу данные в литературе достаточно противоречивы. Понижение температуры выращивания томатов с 25 до 15 °С ингибировало проявление симптомов инфекции *S. michiganensis* [14]. С другой стороны, выращивание при 15 °С дикого вида картофеля *S. acaule* стимулировало колонизацию растений *Cms*, а выращивание при 21 °С делало растения иммунными к патогену [30]. Однако во всех этих экспериментах растения, во-первых, выращивали постоянно при повышенной температуре, во-вторых, использовали температуру (21–23 °С) при которой синтез БТШ в растениях не происходит [52].

Цель настоящей работы – изучить изменение содержания белков теплового шока в тканях картофеля *in vitro* при патогенезе кольцевой гнили.

Материалы и методы

Исследования проводились на растениях картофеля сорта Луговской и сорта Лукьяновский *in vitro*. Картофель сорта Луговской является устойчивым к ряду патогенов, в том числе к кольцевой гнили, картофель сорта Лукьяновский – восприимчивым [50]. Микрклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования. Черенки высаживали на глубину междуузлия в агаризованную питательную среду Мурасиге – Скуга (МС) 4,2 г/л с добавлением сахарозы 30 г/л, пиридоксина 1 мл/л, тиамина 1 мл/л и ферруловой кислоты 1 мл/л, рН 5,8–6,0. Черенки культу-

вировали в факторостатных условиях при температуре 24–25 °С, освещённости 5–6 кЛк и продолжительности фотопериода 16 ч.

Заражение картофеля осуществлялось бактерией *Cms*, штамм Ас 14 05, получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Москва). Бактериальную культуру выращивали на скошенной агаризованной среде, содержащей диализат дрожжевого экстракта (Sigma, США) 10 г/л, глюкозу 15 г/л, агар-агар («Биотехновация», Россия) 10 г/л, 5 г CaCO₃ 5 г/л («Реахим», Россия), pH 7,0. Бактерии культивировали в термостате в темноте при температуре 25 °С.

В первой серии экспериментов в среду роста растений картофеля *in vitro* вносили *Cms* (титр 1·10⁹ КОЕ/мл), растения инкубировали в факторостатных условиях в течение двух суток, затем 2 ч подвергали термообработке в суховоздушном термостате при 26 или 39 °С, далее выделяли тотальный белок.

Во второй серии экспериментов растения картофеля *in vitro* подвергали термообработке в суховоздушном термостате при 26 или 39 °С в течение 2 ч, далее заражали *Cms* и спустя 2 сут. инкубации выделяли тотальный белок.

Выделение белка осуществляли по стандартной методике [8]. Электрофорез в ПААГ проводили по модифицированной системе Лэммли в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell (Bio-Rad, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, США) проводили в приборе для блоттинга (Bio-Rad, США). В работе использовали антитела против БТШ101 (AgriserAs 07253) и БТШ17,6ТТР 2 (AgriserAs 07255) класс I.

Результаты и обсуждение

Для выявления действия заражения кольцевой гнилью на синтез БТШ в тканях картофеля провели серию следующих экспериментов. Растения картофеля *in vitro* заражали *Cms* и после 2 сут. инкубации при 26 °С подвергали тепловому стрессу 39 °С (2 ч), затем анализировали изменения в уровне синтеза БТШ101 и БТШ17,6. Коинкубация растений с патогеном производилась в течение 2 сут. Время коинкубации было выбрано в соответствии с результатами ранее проведённых исследований: было показано, что спустя первые сутки коинкубации бактерии проникали в корневую и стеблевую зоны растений обоих сортов. На 2-е сут. у растений сорта Луговской бактерии обнаруживались преимущественно в корневой зоне.

Были получены следующие результаты по содержанию БТШ в тканях картофеля *in vitro* (рис. 1). В контрольных растениях, не подвергнутых действию теплового стресса и заражения, синтез исследуемых белков не был ярко выражен. Тепловая обработка при 39 °С индуцировала синтез БТШ101 и БТШ17,6 в картофеле обоих сортов.

Заражение растений картофеля *Cms* влияло на индукцию синтеза БТШ у восприимчивого и устойчивого сортов различным образом. В растениях сорта Лукьяновский заражение несколько индуцировало синтез БТШ, а у сорта Луговской содержания БТШ не наблюдалось. Согласно литературным

даным, бактериальный элиситор харпин активировал экспрессию ряда генов БТШ у клеток *A. thaliana*. Однако активация экспрессии имела временный характер и наблюдалась через 30 мин обработки, а через 4 ч экспрессия снижалась ниже контрольного уровня [31]. Можно предположить, что аналогичное явление наблюдается и в растениях картофеля *in vitro* при заражении *Sms*. Вероятно, динамика изменения уровня БТШ имеет различный характер у устойчивого и восприимчивого сортов.

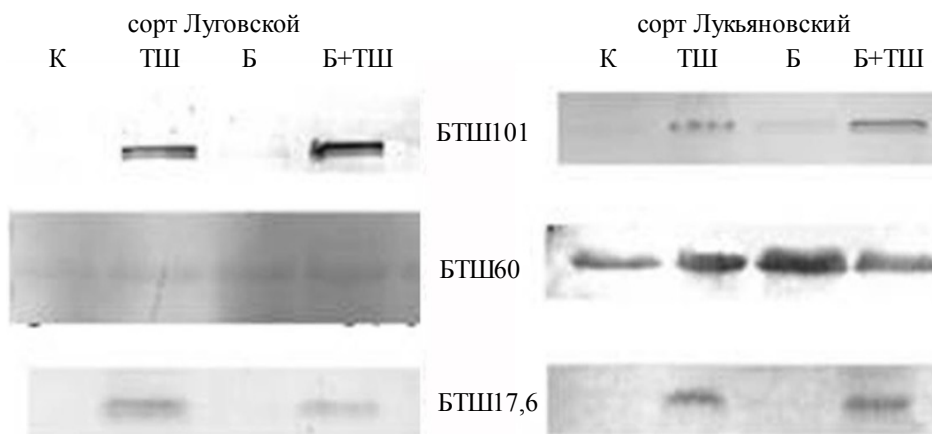


Рис. 1. Содержание БТШ в тканях картофеля сортов *Луговской* и *Лукьяновский in vitro*. Растения картофеля инокулированы *Sms* и спустя 2 сут. коинкубации подвержены тепловой обработке при 39 °С (2 ч). К – контрольные растения; ТШ – растения, обработанные при 39 °С (2 ч); Б – растения, инокулированные *Sms* (штамм Ас-1405); Б+ТШ – растения, инокулированные *Sms* и обработанные при 39 °С (2 ч). Представлены данные типичного эксперимента, $n = 4$

При заражении картофеля отмечалось повышение содержания БТШ101 и БТШ17,6 в тканях восприимчивого сорта и не был отмечен их синтез в тканях устойчивого сорта. Такие данные свидетельствуют, что восприимчивый сорт вследствие отсутствия специфических рецепторов к изучаемому патогену воспринимает бактерию *Sms* как и любой другой стрессовый фактор и отвечает на него неспецифической реакцией – синтезом БТШ. У растений устойчивого сорта, благодаря наличию специфических к *Sms* рецепторов происходит распознавание патогена, запускается каскад сигнальных систем [2], что приводит к регуляции экспрессии генов, и вероятно, синтезу белков направленного противомикробного действия. Способность заражённых растений синтезировать БТШ в ответ на тепловой стресс не имела сортовой специфики. Заражение растений как устойчивого, так и восприимчивого сорта усиливало способность растений синтезировать БТШ101 при тепловом стрессе (см. рис. 1). Содержание БТШ60 не менялось во всех образцах, что логично, так как этот белок относят к группе «белков домашнего хозяйства».

Для выявления преадаптации картофеля к биотическому стрессу в результате влияния повышенной температуры была проведена серия экспериментов. Растения сначала подвергались тепловому шоку (39 °С, 2 ч), далее заражались патогеном, а спустя 2 сут. анализировались на содержание БТШ в тканях. Были получены следующие результаты (рис. 2).

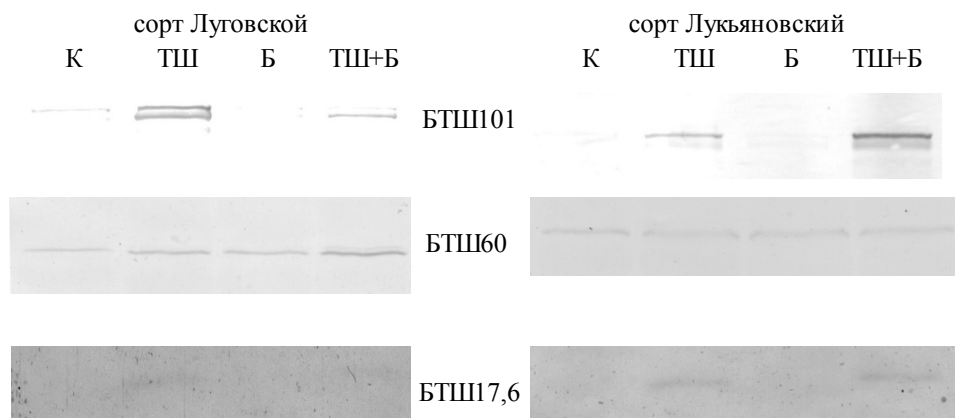


Рис. 2. Содержание БТШ в тканях картофеля сортов Луговской и Лукьяновский *in vitro*. Растения картофеля подвержены тепловой обработке при 39 °С (2 ч), затем инокулированы *Cms*. Содержание БТШ определено спустя 2 сут. коинкубации. К – контрольные растения; ТШ – растения, обработанные при 39 °С (2 ч); Б – растения, инокулированные *Cms* (штамм Ас-1405); ТШ+Б – растения, обработанные при 39 °С (2 ч) и инокулированные *Cms*. Представлены данные типичного эксперимента, $n = 4$

Интерес представляет то, что высокое содержание БТШ наблюдалось в тканях картофеля спустя 2 сут. после теплового воздействия. Так, результаты показали, что тепловой стресс приводил к повышению содержания БТШ17,6 и к значительному увеличению содержания БТШ101 в тканях картофеля обоих сортов. Заражение не влияло на содержание БТШ101 и БТШ17,6 в тканях картофеля обоих сортов. Вероятно, это объясняется тем, что у устойчивого сорта энергия клетки тратится на синтез иных белков. У растений восприимчивого сорта в настоящем эксперименте (см. рис. 2), в отличие от картины, наблюдаемой в первой серии экспериментов (см. рис. 1), отмечается отсутствие БТШ при заражении, что может быть связано с пониженным жизненным потенциалом растений вследствие поражения *Cms*. Способность заражённых растений синтезировать БТШ в ответ на тепловой стресс имела сортовую специфику (см. рис. 2).

В контрольных растениях устойчивого сорта содержания БТШ было незначительно, тепловой стресс способствовал усилению накопления БТШ101, инфицирование растений *Cms* не приводило к повышению содержания БТШ. Заражение растений этого сорта после теплового стресса снижало способность растений синтезировать БТШ101 по сравнению с содер-

жанием этого белка в тканях неинфицированных растений, подвергнутых термообработке (см. рис. 2). Это объясняется, вероятно, тем, что тепловая обработка растений производилась за двое суток до выделения белка и перед заражением. Растения устойчивого сорта благодаря наличию специфических рецепторов к настоящему патогену смогли его распознать и запустить каскад защитных механизмов для подавления распространения инфекции. При этом как неспецифический ответ на стрессовый фактор в небольшом количестве происходил синтез БТШ (см. рис. 2). Известно, что отбор больных кольцевой гнилью растений осложняется латентным характером заболевания [36], что требует применения специальных методов идентификации возбудителя. По этой же причине не существует сортов картофеля, полностью устойчивых к *Sms*. При отсутствии симптомов заболевания на вегетативной стадии бактерия способна проникать в клубень и колонизировать растение. Поэтому использование относительно устойчивых сортов, особенно в условиях глобального потепления, не рекомендуется, так как это будет способствовать неконтролируемому распространению заболевания.

В тканях контрольных растений восприимчивого сорта содержания БТШ не отмечалось, тепловой стресс способствовал синтезу БТШ101, однако в меньшей степени, чем в тканях картофеля устойчивого сорта. Инфицирование растений *Sms* не приводило к повышению содержания БТШ (см. рис. 2) в отличие от ситуации в предыдущей экспериментальной серии (см. рис. 1). Вероятно, это обусловлено различными временными точками наблюдения.

Тепловое воздействие способствовало преадаптации картофеля к дальнейшему стрессовому воздействию только у растений восприимчивого сорта. Наблюдалось повышение содержания БТШ у подвергнутых тепловому стрессу и заражённых растений по сравнению с показателем в тканях подвергнутых термообработке неинфицированных растений. Уровень содержания БТШ101 у таких растений был приблизительно таким же, как у заражённых, и затем непосредственно перед выделением белка обработанных теплом растений. Вероятно, растения восприимчивого сорта детектируют настоящий фитопатоген как неспецифический стрессовый фактор и потому реагируют на него усилением синтеза БТШ. При этом высокий уровень содержания белков поддерживается несколько суток, что также может свидетельствовать о повышенной стрессовой нагрузке.

Заключение

На основании результатов экспериментов можно заключить, что тепловое воздействие на растения картофеля независимо от сорта приводит к повышению содержания БТШ как при предварительном, так и при последующем инфицировании. Согласно литературным данным [47] это снижает способность растений к синтезу противомикробных белков.

Таким образом, можно ожидать, что возросшая в связи с глобальным потеплением климата нагрузка на растительные организмы может препятствовать их успешной борьбе с патогенными бактериями, ареал которых в результате будет расширяться на северные и восточные территории.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ (мол_а № 16-34-00806).

Список литературы

1. Влияние климатических изменений на урожайность картофеля и моркови в условиях Алтайского Приобья / Е. Г. Пивоварова [и др.] // Изв. АГУ. Биол. науки. – 2011. – № 3. – С. 40–44.
2. Влияние экзополисахаридов возбудителя кольцевой гнили на кинетические параметры аденилатциклаз растений картофеля / Л. А. Ломоватская [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2011. – Т. 441 – С. 1–4.
3. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б. В. Анисимов [и др.]. – М. : Картофелевод, 2009. – 272 с.
4. Колупаев Ю. Е. Ферментативные источники активных форм кислорода в растительных клетках: регуляция активности и участие в стрессовых реакциях / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец, Т. О. Ястреб // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету Серія Біологія. – 2012. – Vol. 1(25). – Р. 6–22.
5. Малиновский В. И. Механизмы устойчивости растений к вирусам / В. И. Малиновский. – Владивосток : Дальнаука, 2010. – 324 с.
6. Медведев С. С. Кальциевая сигнальная система растений / С. С. Медведев // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – С. 1–24.
7. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе / Е. Г. Рихванов [и др.] // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 155–169.
8. Побежимова Т. П. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Т. П. Побежимова, А. В. Колесниченко, О. И. Грабельных. – М. : НПК «Промэкобезопасность», 2004. – 98 с.
9. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В. Д. Креславский [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – С. 163–178.
10. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Справочное издание – М. : Ред. журн. «Защита и карантин растений», 2013. – 636 с.
11. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М. : Наука, 2002. – 294 с.
12. Третьякова О. М. Экспрессия PR-генов при бактериальной инфекции / О. М. Третьякова, А. И. Евтушенков // Тр. БГУ. – 2011. – № 6. – С. 163–167.
13. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes / Y. Wang [et al.] // Mol. Plant Microbe Interact. – 2009. – Vol. 22. – P. 498–506.
14. Chang R. J. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato / R. J. Chang, S. M. Ries, J. K. Pataky // Plant Disease. – 1992. – Vol. 76. – P. 1150–1155.
15. Chen S. R. Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae* / S. R. Chen, D. D. Dunigan, M. B. Dickman // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – Vol. 15. – P. 1315–1325.
16. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems / K. A. Garrett [et al.] // Annu. Rev. Phytopathol. – 2006. – Vol. 44. – P. 489–509.
17. Climate change: can wheat beat the heat? / R. Ortiz [et al.] // Agriculture, Ecosystems and Environment. – 2008. – Vol. 126. – P. 46–58.
18. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota / H. C. Harvell [et al.] // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 2158–2162.

19. Colombatti F. Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath? / F. Colombatti, D. H. Gonzalez, E. Welchen // *Mitochondrion*. – 2014. – Vol. 3. – P. 1567–1249.
20. Craita E. B. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops / E. B. Craita, T. Gerats // *Front Plant Sci*. – 2013. – Vol. 4. – P. 273.
21. Cvetkovska M. Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species / M. Cvetkovska, G. C. Vanlerberghé // *Plant Cell Environ*. – 2013. – Vol. 36. – P. 721–732.
22. Downy mildew (*Plasmopara viticola*) epidemics on grapevine under climate change / F. Salinari [et al.] // *Glob. Change Biol*. – 2006. – Vol. 12. – P. 1299–1307.
23. Effect of Extreme Temperatures on Powdery Mildew Development and Hsp70 Induction in Tomato and Wild *Solanum* spp. / L. Kubienová [et al.] // *Plant Protect. Sci*. – 2013. – Vol. 49. – P. 41–55.
24. Eichenlaub R. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens / R. Eichenlaub, K. H. Gartemann // *Annu Rev. Phytopathol*. – 2011. – Vol. 49. – P. 445–464.
25. Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens / T. Vellosillo [et al.] // *Plant Physiol*. – 2010. – Vol. 154. – P. 444–448.
26. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot / J. M. van der Wolf [et al.] // *Plant Research International B.V. Report*. – 2005. – Vol. 95. – 44 p.
27. Heat-induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) is associated with a burst of active oxygen species / L. Vallelian-Bindschedler [et al.] // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 1998. – Vol. 52. – P. 185–199.
28. Heat tolerance in plants / A. Wahid [et al.] // *An overview. Environmental and Experimental Botany*. – 2007. – Vol. 61. – P. 199–223.
29. Induction of a Small Heat Shock Protein and its Functional Roles in Nicotiana Plants in the Defense Response Against *Ralstonia solanacearum* / M. Maimbo [et al.] // *Plant Physiol*. – 2007. – Vol. 145. – P. 1588–99.
30. Infection of plant material derived from *Solanum acaule* with *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: temperature as a determining factor in immunity of *S. acaule* to bacterial ring rot / J. Laurila [et al.] // *Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 52. – P. 496–504.
31. Krause M. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells / M. Krause, J. Durner // *Mol. Plant Microbe Interact*. – 2004. – Vol. 17. – P. 131–139.
32. Logan D. Mitochondrial and Cytosolic Calcium Dynamics Are Differentially Regulated in Plants / D. Logan, M. R. Knight // *Plant Physiol*. – 2003. – Vol. 133. – P. 21–24.
33. Ma W. The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity / W. Ma, G. A. Berkowitz // *Cell Microbiol*. – 2007. – Vol. 9. – P. 2571–2585.
34. Mina U. Effects of Climate Change on Plant Pathogens / U. Mina, P. Sinha // *Environ. News*. – 2008. – Vol. 14. – P. 6–10.
35. Molecular mechanisms of the plant heat stress response / A. L. Qu [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2013. – Vol. 432. – P. 203–207.
36. Nelson G. A. *Corynebacterium sepedonicum* in potato: Effect of inoculum concentration on ring rot symptoms and latent infection / G. A. Nelson // *Can. J. Plant Pathol*. – 1982. – Vol. 4. – P. 129–133.

37. Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection / J. Piterková [et al.] // *Plant Sci.* – 2013. – Vol. 207. – P. 57–65.
38. Prash C. M. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture / C. M. Prash, U. Sonnewald // *Plant Physiol.* – 2014. – Vol. 162. – P. 1849–1866.
39. Range and severity of a plant disease increased by global warming / N. Evans [et al.] // *J. R. Soc. Interface.* – 2007. – Vol. 5. – P. 525–531.
40. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress / N. Suzuki [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2012. – Vol. 35. – P. 259–270.
41. Saidi Y. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance / Y. Saidi, A. Finka, P. Goloubinoff // *New Phytol.* – 2011. – Vol. 190. – P. 556–565.
42. Schweizer P. Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* / P. Schweizer, L. Vallélian-Bindschedler, E. Mösinger // *Physiol. Mol.* – 1995. – Vol. 47. – P. 51–66.
43. Singh A. Plant Hsp100/ClpB-like proteins: poorly-analyzed cousins of yeast ClpB machine / A. Singh, A. Grover // *Plant Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 74. – P. 395–404.
44. Steinhorst L. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling / L. Steinhorst, J. Kudla // *Plant Physiol.* – 2013. – Vol. 163. – P. 471–485.
45. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase / L. Király [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2008. – Vol. 89. – P. 799–808.
46. Temperature induced susceptibility to *Phytophthora sojae* in soybean isolines carrying different Rps genes / M. Gijzen [et al.] // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1996. – Vol. 48. – P. 209–215.
47. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses / J. Kilian [et al.] // *Plant J.* – 2007. – Vol. 50. – P. 347–363.
48. The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* – tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection / A. Savidor [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2012. – Vol. 11. – P. 736–750.
49. The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress *in vivo* indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions / E. Basha [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 7566–7575.
50. The role of extracellular pH-homeostasis in potato resistance to ring-rot pathogen / A. S. Romanenko [et al.] // *J. Phytopathol.* – 1999. – Vol. 147. – P. 679–686.
51. van Loon L.C. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants / L. C. van Loon, M. Rep, C. M. J. Pieterse // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 135–162.
52. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants / E. Vierling // *Plant Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 42. – P. 579–620.
53. Xie Z. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells / Z. Xie, Z. Chen // *Plant Physiol.* – 1999. – Vol. 120. – P. 217–226.

Heat Shock Proteins of Potatoes *in vitro* at Pathogenesis Ring Rot Disease

A. I. Perfilova¹, A. G. Pavlova², B. B. Buh'yanova²

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

² Irkutsk State University, Irkutsk

Abstract. The content of heat shock proteins in tissue of potatoes of two cultivars (Lugovskoy and Lukyanovsky) infected with the ring rot disease causative agent *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and treated with heat shock (39 °C, 2 h) was investigated. The synthesis of HSP101 and HSP17.6 in potato plants of the two cultivars wasn't revealed in control conditions. The ability of infected plants to synthesize HSPs in response to heat stress was non-specific. Heat shock of 39 °C induced the synthesis of HSPs in tissues in both potato cultivars. The infection lightly induced the synthesis of HSPs in potato plants of cultivar Lukyanovsky, and there were no HSP observed in plants of cultivar Lugovsky. This may be attributed to different dynamics of HSP levels in plants of these two cultivars. For the identification of preadaptation of potato plants to biotic stress, plants at first were treated by heat shock (39 °C, 2 h), then were infected by the pathogen, and at last 2 days later the content of HSPs was identified. The fact that the high content of HSPs was observed in potato tissues 2 days later after heat stress effect is of interest. The infection of potato plants of cultivar Lugovsky following the heat stress reduced their ability to synthesize HSP60 and HSP17,6 in comparison to non-infected plants treated by heat. However, the increase in content of HSP101 in tissues of the infected and heat-treated plants in comparison to the content of HSPs in tissues of plants which were infected and treated by heat was observed.

Keywords: global warming, heat shock proteins, pathogenesis-related proteins, pathogenesis, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Перфильева Алла Иннокентьевна
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел./факс: (3952) 51-07-54
e-mail: alla.light@mail.ru

Perfilova Alla Innokentyevna
Candidate of Science (Biology),
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel./fax: (3952) 51-07-54
e-mail: alla.light@mail.ru

Павлова Антонина Гавриловна
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: pavlovaantonina2013@yandex.ru

Pavlova Antonina Gavrilovna
Student
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: pavlovaantonina2013@yandex.ru

Бухьянова Баира Бадмажаповна
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: bukhyanova95@mail.ru

Buhyanova Baira Badmazharovna
Student
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: bukhyanova95@mail.ru