



УДК 581.1

Влияние моноодацетата натрия на накопление белков теплового шока в тканях картофеля *in vitro* при тепловом и биотическом стрессах

А. Г. Павлова¹, А. И. Перфильева², А. С. Столбиков^{1,2}

¹ Иркутский государственный университет, Иркутск

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: alla.light@mail.ru

Аннотация. Исследовано влияние тепловой обработки (39 °С, 2 ч), митохондриального ингибитора – моноодацетата натрия (МИА) и заражения картофеля возбудителем заболевания кольцевая гниль – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) (как отдельно, так и в комбинациях) на накопление белков теплового шока: БТШ101, БТШ60, БТШ17.6 в тканях картофеля сортов Луговской и Лукьяновский *in vitro*. Показано, что при тепловом воздействии (39 °С, 2 ч) в тканях картофеля увеличивается содержание этих белков у растений обоих сортов. Наибольшее повышение отмечается для белка БТШ101. Заражение растений патогеном *Cms* приводит к усиленному накоплению БТШ101, БТШ60, БТШ17.6 в тканях картофеля сорта Лукьяновский, у картофеля сорта Луговской не отмечалось синтеза исследуемых белков. Во всех вариантах с добавлением МИА было отмечено повышенное содержание БТШ, наиболее яркий эффект – у растений сорта Лукьяновский. Совместное воздействие МИА и повышенной температуры на растения приводило к стимуляции накопления БТШ101 и БТШ60 в тканях растений сорта Лукьяновский. При заражении растений совместно с обработкой МИА усиления накопления БТШ практически не отмечалось. Воздействие на растения всех трёх стрессовых факторов: бактерий, моноодацетата и повышенной температуры повышало содержание всех исследуемых БТШ в тканях картофеля обоих сортов, но не столь значимо, как воздействие МИА и температуры без инфицирования картофеля *Cms*. В настоящей работе на картофеле впервые показано, что обработка МИА активирует накопление БТШ, что указывает на участие митохондрий в регуляции экспрессии БТШ.

Ключевые слова: картофель, тепловой стресс, белки теплового шока, моноодацетат натрия, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Введение

В ответ на тепловое воздействие в клетках растений активируется экспрессия генов, кодирующих белки теплового шока (БТШ). Повышение уровня кальция и усиление продукции АФК при действии теплового стресса оказывает значительное влияние на этот процесс [9]. Есть основания предполагать, что митохондрии растительной клетки принимают активное участие в модуляции уровня АФК и задействованы в регуляции гомеостаза внутриклеточного кальция [4]. Было показано, что тепловое воздействие

вызывает повышение митохондриального мембранного потенциала, сопровождающееся усилением продукции АФК в клетках озимой пшеницы [6]. Вероятно, митохондрии растительных клеток продуцируют АФК и регулируют экспрессию ядерных генов и при биотическом стрессе [7]. Активация экспрессии гена митохондриальной альтернативной оксидазы наблюдается у растений при обработке митохондриальными ингибиторами и при биотическом стрессе [8]. Соответственно, можно предположить, что митохондрия растительной клетки может участвовать в регуляции экспрессии БТШ. В настоящей работе предполагается получить принципиально новые данные об участии митохондрий в активации защитной реакции растения-хозяина синтезом БТШ в ответ на заражение патогеном. Вероятно, при одновременном наложении двух факторов (теплового стресса и патогенеза), что часто встречается в естественных климатических условиях обитания растений, именно в митохондриях будет определяться «сценарий» развития защитных реакций клетки.

Материалы и методы

Участие митохондрий в активации защитной реакции растения-хозяина в ответ на заражение патогеном исследовалось нами на модельной системе: растения картофеля *in vitro* сорта Луговской (устойчивый к возбудителю кольцевой гнили) и Лукьяновский (восприимчивый к возбудителю кольцевой гнили). Возбудитель заболевания кольцевая гниль картофеля грамположительная бактерия *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) штамм Ас 14 05 получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Москва). Для выявления роли митохондрий использовали моноодацетат натрия (МИА) – ингибитор ферментов, содержащих сульфогидрильные группы [3; 5], в частности ключевого фермента гликолиза – триозофосфатдегидрогеназы. Предполагается, что МИА, ингибируя гликолиз, нарушит функционирование митохондрий, что может повлиять на экспрессию генов, кодирующих защитные белки. Кроме того, нами ранее показано, что обработка 1 мМ МИА оказывает ярко выраженный токсический эффект на жизнеспособность клеток *Cms* и грибов, снижая интенсивность дыхания клеток [1].

Для экспериментов в среду для роста растений картофеля *in vitro* вносили *Cms* (титр = $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), растения инкубировали в факторостатных условиях в течение 2 сут. Далее вносили 1 мМ водного раствора МИА (Sigma, США), подвергали двухчасовой термообработке в суховоздушном термостате при 26 или 39 °С, после чего выделяли тотальный белок по стандартной методике. 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 (AgriserasAs 07253) и БТШ17.6ТТР 2 (AgriserasAs 07255) класс I. Использовано оборудование ЦКП «Биоаналитика» и коллекции ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены результаты по содержанию БТШ в тканях картофеля *in vitro*.

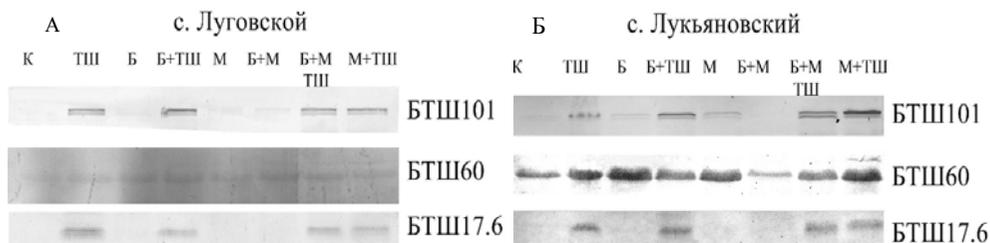


Рис. Содержание БТШ в тканях картофеля *in vitro* сортов Луговской (А) и Лукьяновский (Б) при заражении растений *Sms*, обработке их моноиодацетатом натрия и тепловым шоком. Результаты Вестерн-блоттинга. К – контрольные растения; ТШ – растения, обработанные при 39 °С (2 ч); Б – растения, заражённые *Sms* (штамм Ас-1405); Б+ТШ – заражённые *Sms* растения, обработанные при 39 °С (2 ч); М – растения, обработанные моноиодацетатом натрия; Б+М – заражённые *Sms* растения, обработанные моноиодацетатом; Б+М+ТШ – заражённые *Sms* растения, обработанные моноиодацетатом и температурой 39 °С (2 ч); М+ТШ – растения, обработанные моноиодацетатом натрия и температурой 39 °С (2 ч). Представлены данные типичного эксперимента

В контрольных растениях, не подвергнутых действию теплового стресса и заражению, накопление БТШ101 и БТШ17.6 не отмечалось, присутствовал белок БТШ60. Тепловая обработка при 39 °С индуцировала синтез БТШ101 и БТШ17.6 в клетках картофеля обоих сортов. Заражение *Sms* в следовых количествах индуцировало синтез БТШ101 и БТШ17.6 и значительно усиливало синтез БТШ60 в растениях сорта Лукьяновский, а у растений сорта Луговской накопления БТШ не наблюдалось. Такие данные свидетельствуют, что восприимчивый сорт вследствие отсутствия специфических рецепторов к изучаемому патогену воспринимает бактерию *Sms* как 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 и запускается каскад сигнальных систем [2], что приводит к регуляции экспрессии генов и, вероятно, синтезу белков направленного противомикробного действия. Заражение растений как устойчивого, так и восприимчивого сорта значительно усиливало способность растений синтезировать БТШ при тепловом стрессе 39 °С (см. рис., вариант Б+ТШ).

Обработка растений МИА индуцировала синтез белка БТШ101 и БТШ60 в тканях картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский. Подобного эффекта в тканях картофеля устойчивого сорта не отмечалось: у сорта Луговской, по сравнению с контролем, содержание БТШ101 не превышало следовых концентраций. При комбинированной обработке растений в варианте Б+МИА в тканях обоих сортов картофеля не наблюдалось выраженно-

го синтеза БТШ101 и БТШ17.6. У сорта Луговской отмечалось низкое содержание БТШ101 в этом варианте. Совместное воздействие МИА и повышенной температуры на растения (вариант М+ТШ) приводило к росту содержания исследуемых БТШ, наиболее ярко это выражалось у растений сорта Лукьяновский (см. рис.). В этом варианте отмечено максимальное содержание БТШ101 и БТШ60. В варианте заражения совместно с обработкой МИА (Б+М) усиления накопления БТШ практически не отмечалось, у сорта Луговской БТШ101 содержался в следовых количествах. Воздействие всех трёх стрессовых факторов – бактерий, моноиодацетата и повышенной температуры (Б+М+ТШ) повышало содержание всех исследуемых БТШ в тканях картофеля обоих сортов, но не столь значимо, как воздействие только МИА и температуры.

Выводы

Согласно полученным результатам, обработка растений МИА оказывала эффект на содержание БТШ в тканях картофеля. Можно отметить некоторое повышение содержания БТШ в тканях картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский при его обработке МИА. У растений обоих сортов в варианте М+ТШ накопление БТШ было значительно выше, чем только при ТШ, особенно это выражено у сорта Лукьяновский.

Таким образом, основываясь на результатах экспериментов, можно заключить, что воздействие повышенной температуры значительно повышает экспрессию генов, кодирующих БТШ, и соответственно, содержание этих белков (БТШ101, БТШ60 и БТШ17,6). Обработка МИА активирует тепловую экспрессию генов БТШ, что указывает на участие митохондрий в регуляции их экспрессии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ мол_а № 16-34-00806).

Список литературы

1. Влияние моноиодацетата на термотолерантность *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Е. В. Рымарева [и др.] // J. Stress Physiol. Biochem. – 2008. – Vol. 4 (2). – P. 4–13.
2. Влияние экзополисахаридов возбудителя кольцевой гнили на кинетические параметры аденилатциклаз растений картофеля / Л. А. Ломоватская [и др.] // ДАН. – 2011. – Т. 441. – С. 14.
3. Кнорре Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – М.: Высш. шк., 2000. – 479 с.
4. 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.
5. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.] – М.: Мир, 1991. – 543 с.
6. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы / А. В. Федяева [и др.] // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 11. – С. 1476–1486.

7. 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.

8. Cvetkovska M. Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species / M. Cvetkovska, G. C. Vanlerberghe // *Plant Cell Environ.* – 2013. – Vol. 36. – P. 721–732.

9. Saidi Y. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance / Y. Saidi, A. Finka, P. Goloubinoff // *New Phytol.* – 2011. – Vol. 190 (3). – P. 556–565.

The Effect of Iodoacetic Acid Sodium Salt on Accumulation of Heat Shock Proteins in Potato Tissues *in vitro* under Heat and Biotic Stresses

A. G. Pavlova¹, A. I. Perfileva², A. V. Stolbikov^{1,2}

¹*Irkutsk State University, Irkutsk*

²*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

Abstract. Three factors – heat (39 °C, 2 h), mitochondrial inhibitor iodoacetic acid sodium salt (IAS) and infection with the causative agent of a disease ring rot – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) (as separately, and in combinations) on accumulation of thermal shock proteins: HSP101, HSP60, HSP17.6 in tissues of potatoes of two varieties Lugovskoy and Lukyanovsky *in vitro* was examined. It is shown the heat influence (39 °C, 2 h) increases the content of these at potato plants of both varieties. The greatest increase is noted for HSP101. Infection of plants with a pathogen of *Cms* is led to the strengthened accumulation of HSP101, HSP60, HSP17.6 in tissues by Lukyanovsky, at Lugovskoy potato the synthesis of the studied proteins wasn't noted. In all options with addition of IAS the increased maintenance of HSP, the brightest effect – at plants of Lukyanovsky was noted. Joint impact of IAS and the increased temperature led to stimulation of accumulation of HSP101 and HSP60 in tissues of Lukyanovsky. At infection of plants and IAS processing jointly the strengthening of HSP accumulation wasn't noted. Influence of all three stressful factors: bacteria, monoiodacetate and the increased temperature in common raised the maintenance of all HSP in potato tissues of both varieties, but it isn't as significant as influence of IAS and temperature with no infection of *Cms*. In the article is shown for the first time that the processing of IAS activates the accumulation of HSP, it indicates the participation of mitochondria in regulation of HSP expression.

Keywords: potato, heat shock, heat shock proteins (HSP), iodoacetic acid sodium salt, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

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

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

Perfileva 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

Столбиков Алексей Сергеевич
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
Иркутский государственный
университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24–18–70
e-mail: valkir5@yandex.ru

Stolbikov Aleksey Sergeevich
Candidate of Science (Biology),
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–18–70
e-mail: valkir5@yandex.ru