

На правах рукописи



**ПЕРФИЛЬЕВА**  
Алла Иннокентьевна

**ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОГО ШОКА  
И МОНОИОДАЦЕТАТА НАТРИЯ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ  
*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* С КАРТОФЕЛЕМ**

**03.01.05 – физиология и биохимия растений**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Иркутск - 2012**

Работа выполнена в лаборатории фитоиммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук Рихванов Евгений Геннадьевич

Официальные оппоненты:  
доктор биологических наук Верхотуров Василий Владимирович  
кандидат биологических наук Прадедова Елена Владимировна

Ведущая организация:  
ФГОУ ВПО Иркутская государственная сельскохозяйственная академия

Защита диссертации состоится «11» сентября 2012 г. в 14 ч на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952)510754, e-mail: [matmod@sifibr.irk.ru](mailto:matmod@sifibr.irk.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

Текст автореферата размещен на сайте Института ([www.sifibr.irk.ru](http://www.sifibr.irk.ru)).

Автореферат разослан «2» августа 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 003.047.01  
кандидат биологических наук

 Г.П. Акимова

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Грамположительная бактерия *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus* (*Cms*) вызывает заболевание, известное как кольцевая гниль картофеля (Eichenlaub, Gartemann, 2011). До 45% урожая картофеля теряется в результате заражения *Cms* (Калач и др., 2010). Развитие симптомов заболевания часто характеризуется латентной фазой, поэтому не существует эффективных методов борьбы с данным заболеванием.

На устойчивость растений к патогенным микроорганизмам, скорость их колонизации и развитие симптомов заболевания влияют многие факторы. Согласно современным представлениям немаловажную роль в этих процессах играет температура. Установлено, что изменение температуры инкубации в одних случаях может усиливать, а в других подавлять проявление симптомов заболевания (Garrett et al., 2006). Существенное влияние оказывают и такие факторы, как ингибиторы дыхательной цепи. Некоторые из них способны значительно повышать фунгицидное действие высоких температур (Rikhvanov et al., 2002). Токсическое действие многих пестицидов, используемых в настоящее время в сельском хозяйстве, определяется их способностью подавлять функционирование дыхательной цепи патогена (Анисимов и др., 2009; Leroux et al., 2010). Большинство таких препаратов обладает высокой персистентностью (Горбатов и др., 2008). Персистентность пестицидов снижается при повышении температуры (Мельников и др., 1980). Представляется чрезвычайно важным исследовать эффект высоких температур в сочетании с бактерицидным действием ингибиторов дыхательной цепи на устойчивость растений к патогенным микроорганизмам. Для этого необходимы такие пестициды, которые бы обладали высоким бактерицидным эффектом, но в тоже время быстро бы разлагались на неопасные соединения после температурного воздействия. Предъявляемым требованиям соответствует моноиодацетат натрия (МИА), являющийся ингибитором триозофосфатдегидрогеназы, одного из ключевых ферментов гликолиза (Webb, 1963). Подавляя гликолиз, МИА ингибирует дыхание (Варакина, 1971). МИА отличается слабой персистентностью и при повышении температуры до 40°C через 2 ч полностью разлагается на уксусную кислоту и йод (Webb, 1963). Показано, что моноиодацетат натрия является индуктором фитоалексинов, антимикробных соединений у сои (Keen et al., 1981). В связи с рассмотренными характеристиками, представляло интерес изучить эффект МИА и повышенной температуры на жизнеспособность *Cms* и картофеля, а также на взаимодействие патогена и его растения-хозяина.

В ответ на мягкое повышение температуры в растениях синтезируются белки теплового шока (БТШ) (Wang et al., 2004). В ряде случаев вторжение патогена вызывает у растений повышение синтеза некоторых БТШ (Duan et al., 2011). Неизвестно, как повышение синтеза БТШ сказывается на способности картофеля противостоять вторжению *Cms*.

### **Цели и задачи исследования.**

Целью настоящей работы явилось изучение влияния теплового шока и моноиодацетата натрия на взаимодействие возбудителя кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus* с картофелем.

Цель определяла необходимость решения следующих задач:

1) исследовать эффект теплового шока (45°C) и МИА на жизнеспособность клеток *Cms*;

2) исследовать комбинированный эффект теплового шока (45°C) и МИА на жизнеспособность суспензионной культуры клеток картофеля, культуры картофеля *in vitro* и прорастание клубней картофеля;

3) изучить влияние теплового шока (45°C) и МИА на продуктивность картофеля в полевом и вегетационном экспериментах;

4) изучить влияние теплового стресса (39°C) и МИА на проникновение *Cms* в растения картофеля *in vitro*;

5) изучить влияние заражения, теплового стресса (39°C) и МИА на синтез БТШ в растениях картофеля *in vitro*.

**Научная новизна.** В настоящей работе впервые продемонстрировано, значительное снижение жизнеспособности бактерий *Cms*, суспензионной культуры клеток картофеля и растений картофеля *in vitro* в ходе термической обработки в присутствии МИА. Подобный эффект не наблюдается на клетках с замедленным метаболизмом (клубни картофеля). Обработка клубней МИА способна повышать продуктивность картофеля.

Установлено, что усиление проникновения *Cms* в растения картофеля *in vitro* происходит при тепловом стрессе (39°C), который индуцирует синтез БТШ, а также при обработке МИА. Полученные результаты, а также данные биоинформационного анализа указывают, что тепловой стресс подавляет активацию защитных реакций растений картофеля *in vitro* в ответ на вторжение *Cms*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные результаты вносят вклад в понимание физиологических механизмов иммунитета растений при биотическом и абиотическом (тепловом) воздействии. В работе впервые получены данные, указывающие на то, что активация одной защитной программы может подавлять другую защитную программу. Так, активация защитных реакций на тепловой стресс может подавлять защитные реакции на биотическое воздействие.

С практической точки зрения, полученные результаты могут быть использованы в оптимизации методов для обеззараживания клубней картофеля. Было показано, что МИА имеет бактерицидный эффект на клетки *Cms*, но не влияет на клубни картофеля и может быть рекомендован для дальнейших испытаний в сельском хозяйстве.

Данные, представленные в работе, указывают, что агенты, которые подавляют функционирование митохондрий, могут оказывать обеззараживающий эффект на стадии покоя растения (клубни), но могут усиливать проникновение патогена в растения на стадии их активного роста и развития. К усилению колонизации растений патогенными микроорганизмами может приводить также повышение температуры окружающей среды.

**Личное участие автора в получении научных результатов.** Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментальной части работы, которая проводилась в период с 2006 по 2012 гг., самостоятельно осуществлял статистическую обработку и интерпретацию полученных данных, лично участвовал в написании статей.

**Апробация работы.** Результаты исследований по теме диссертации были представлены на Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2007); на Научно-теоретической конференции ИГУ (Иркутск, 2008); на Международной научно-практической конференции «Проблемы современного картофелеводства» (Минск,

2008); на Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009); на Всероссийском симпозиуме физиологов растений (Москва, 2010); на научно-практической конференции, посвященной 80-летию ИрГТУ (Иркутск, 2010); на Всероссийском съезде физиологов растений (Нижний Новгород, 2011); на заочной II Научно-практической конференции с международным участием «Эколого-биологические проблемы Сибири и сопредельных территорий» (Нижевартовск, 2011); на Международной научно-практической заочной конференции «Современные изменения климата: социальные, экономические и экологические последствия» (Чебоксары, 2011), а также на научной сессии СИФИБР СО РАН (Иркутск, 2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 4 статьи в журналах из списка ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 224 работы, из них 83 отечественных и 141 зарубежных источников. Работа изложена на 152 страницах, содержит 34 рисунка и 3 таблицы.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали культуры *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), штаммы: 5369 (п. Коренево, Московской обл.), CsR14 (университет г. Турку, Финляндия), Ac-1405 (Всероссийская коллекция микроорганизмов г. Москва).

В работе также были использованы: суспензионная культура клеток картофеля, растения *in vitro*, клубни и вегетирующие растения картофеля (*Solanum tuberosum* L). Сорт Луговской (Украинский НИИ картофельного хозяйства) – устойчивый к *Cms*. Сорт Лукьяновский (ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха) – восприимчивый к *Cms*.

**Культивирование растений *in vitro*.** Микрклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (4,2 г/л) с добавлением 30 г/л сахарозы, 1 мл/л пиридоксина, 1 мл/л тиамина и 1 мл/л феруловой кислоты, pH 5,8-6,0. Черенки культивировали при 26°C, освещенности 5-6 клк. Черенкование проводили через 20 дней (Бутенко, 1984).

**Культивирование суспензионной культуры.** Суспензионную культуру клеток картофеля культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга (4,2 г/л) с добавлением 20 г/л сахарозы, 100 мг/л мезоинозита, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 0,5 мг/л пиридоксина, 0,5 мг/л тиамина, 5 мг/л фолиевой кислоты, 1,0 мг/л аденина, 1 мг/л глицина, 0,1 г/л гидролизата казеина, 0,2 мг/л кинетина, 3 мг/л 2,4 Д, pH 5,8. Колбы помещали на качалку (80 об/мин) для выращивания, в темноте при 26°C.

**Культивирование бактерий.** Культуру *Cms* выращивали на среде YPGA, содержащей 10 г/л дрожжевого экстракта, 15 г/л глюкозы, 10 г/л агар-агара, 5 г/л CaCO<sub>3</sub>, pH 7,0 (Иванова, 1987) в темноте при 26°C. Пересадку на свежую питательную среду проводили через 7-10 дней. Для получения бактериальной суспензии, единичную колонию бактерий переносили в жидкую среду YPGA. Через 5-7 пассажей для сохранения вирулентных свойств бактерии высевали на картофельно-глюкозный агар: 200 г картофеля с добавлением 20 г/л глюкозы, 17 г/л агара-агара.

**Определение дыхательной активности бактерий.** Измерение скорости поглощения кислорода клетками *Sms* проводили на разных фазах роста культуры (2, 7, 13 сутки) на полярографе ОН-105 (Венгрия) с платиновым электродом закрытого типа (электрод Кларка) (Трушанов, 1973).

**Определение жизнеспособности бактериальных и растительных клеток.** Для определения влияния теплового шока и МИА на жизнеспособность клеток *Sms*, использовали 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорид (ТТХ) (Еникеев и др., 1995). Также жизнеспособность бактерий определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ). В экспериментах на бактериях использовали железные чашки и репликатор (рис. 2, А), с помощью которых производили посев на среду роста YPGA.

Жизнеспособность суспензионной культуры клеток картофеля определяли с использованием метода ТТХ (Еникеев и др., 1995). Время инкубации с ТТХ в темноте – 4 часа.

**Влияние МИА и теплового шока на растения картофеля *in vitro*.** В среду роста растений картофеля *in vitro* вносили МИА, подвергали термообработке при 26 или 45°C, 1 ч, отмывали от МИА и выращивали 17 суток при 26°C. На каждый вариант обработки использовали 3-5 растений. В конце опыта производили подсчет желтых листьев и определяли активность общей пероксидазы по методу Бояркина (Бояркин, 1951).

**Заражение растений *in vitro* и клубней картофеля.** Во всех экспериментах растения *in vitro* инфицировали суспензией *Sms* (1 мл) (Титр =  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл).

Клубни картофеля инфицировали суспензией *Sms* уколом (Титр =  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл). В контрольные клубни вводили дистиллированную воду.

**Термическая обработка.** Используемые в работе температуры по типу воздействия классифицировали: 26°C – контроль, 37-39°C – тепловой стресс; 45°C – тепловой шок. Термическую обработку бактериальных клеток (45°C, 1 ч) и клеток суспензии картофеля (37°C, 1 ч; 45°C, 1 ч) проводили на минитермошейкере TS-100 («BioSan», Латвия). Обработку клубней (45°C, 1 ч) и растений картофеля *in vitro* (39°C, 2 ч; 45°C, 1 ч) осуществляли в термостате.

**Определение продуктивности картофеля.** Для вегетационного опыта клубни картофеля сортов Луговской и Лукьяновский (7 клубней на вариант) за две недели до посадки инокулировали уколом *Sms*. До посадки клубни подвергали термообработке 45°C, 1 ч и высаживали в вегетационные сосуды с почвой. После окончания срока вегетации (90 суток) оценивали продуктивность путем определения массы клубней.

Для полевого опыта клубни картофеля (по 10 клубней на вариант) обрабатывали 1 мМ водным раствором МИА, после чего подвергали тепловой обработке 26 или 45°C, 1 ч. Клубни высаживали в поле и после окончания периода вегетации (90 суток) оценивали продуктивность путем определения массы клубней.

**Определение проникновения *Sms* в растения *in vitro*.** Ежедневно, в течение 6 суток, производили высев гомогената из зараженных растений на чашки Петри со средой YPGA. Предварительно растения стерилизовали 10 мин в растворе 10% гипохлорида натрия с добавлением 2 капель детергента Твин 80, промывали 3 раза стерильной водой. Далее растения делили на зоны: зона корней, стебель, верхушка. Каждую зону отдельно растирали, полученный гомогенат соответствующим образом разбавляли и высевали на среду YPGA. Чашки инкубировали при температуре 26°C в темноте 7 суток и определяли КОЕ.

**Электрофорез в ПААГ.** Выделение белка осуществляли по стандартной методике (Побежимова и др., 2004). Количество белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1957). Электрофорез в ПААГ проводили по модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970), на приборе Mini-PRONEAN III Electrophoretic Cell фирма Bio-Rad (USA).

**Вестерн-блоттинг.** Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану ("Sigma", США) проводили в специальном приборе для блоттинга ("BIO-RAD", США). В работе использовали антитела против БТШ101 (Agrisera As 07253) и БТШ17,6 ТТР 2 (Agrisera As 07255) класс I.

**Биоинформационный анализ.** Для анализа изменения экспрессии генов БТШ и генов PR-белков при тепловом стрессе (38°C, 15, 30, 60 и 180 мин) в побегах, корнях и культуре клеток *Arabidopsis thaliana* использовали результаты Kilian et al. (2007) с применением базы данных AtGenExpress (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>).

**Статистическая обработка результатов.** Полученные результаты были статистически обработаны с использованием пакета программ Microsoft Excel. Приведены средние арифметические значения и стандартные отклонения.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Действие теплового шока и МИА на жизнеспособность *Sms*

Многие пестициды являются дыхательными ядами (Анисимов и др., 2009; Legoux et al., 2010). МИА – ингибитор гликолиза, а значит и дыхания (Webb, 1963). Эффект МИА на жизнеспособность *Sms* ранее не исследовался. Скорость поглощения кислорода клетками *Sms* в присутствии МИА снижалась на 30% по сравнению с контролем. Инкубация при температуре 26°C в течение 1 ч показала, что МИА в концентрациях 0,1; 0,3 и 1,0 мМ оказывал бактерицидный эффект на клетки

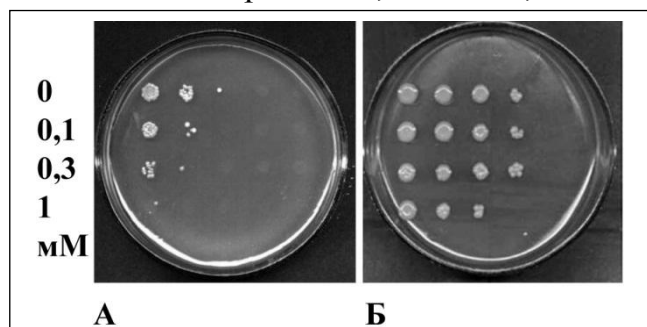


Рис. 1. Влияние МИА на выживаемость *Sms* (штамм 5369).

Клетки *Sms* в логарифмической фазе роста (А) и стационарной фазе роста (Б) обрабатывали 0; 0,1; 0,3; 1,0 мМ МИА при 26°C в течение 1 ч., после чего высевали на среду YPGA. Жизнеспособность *Sms* определяли по образованию КОЕ спустя 7 суток инкубации при 26°C. По горизонтали слева направо представлены разведения бактериальной суспензии (в 10 раз; в 100 раз; в 1000 раз; в 10 000 раз). Представлены данные типичного эксперимента, n=3.

*Sms*, находящиеся в логарифмической фазе роста (2 суток). Причем наибольшая гибель клеток *Sms*, определяемая по образованию КОЕ, наблюдалась при концентрации 1 мМ (рис. 1, А).

Известно, что бактерицидный эффект различных антибиотиков зависит от фазы роста микроорганизмов (Yetka, Wiebe, 1974). На клетки *Sms* в стационарной фазе (7 суток) МИА в концентрации 0,1 и 0,3 мМ не оказывал отрицательного эффекта, и только 1,0 мМ МИА незначительно снижал жизнеспособность клеток бактерий (рис. 1, Б). По-видимому, такой эффект МИА связан с тем, что у более молодых клеток метаболические процессы, в том числе и дыхание, идут более интенсивно по сравнению с бактериями в стационарной фазе роста.

Для определения устойчивости *Sms* к действию теплового шока в работе была определена точка температурной гибели *Sms*. При 50°C все клетки *Sms* в логарифмической фазе погибали за 10 мин. Обработка при 45°C показала, что практически полная гибель клеток в данной фазе наблюдалась после экспозиции в течение

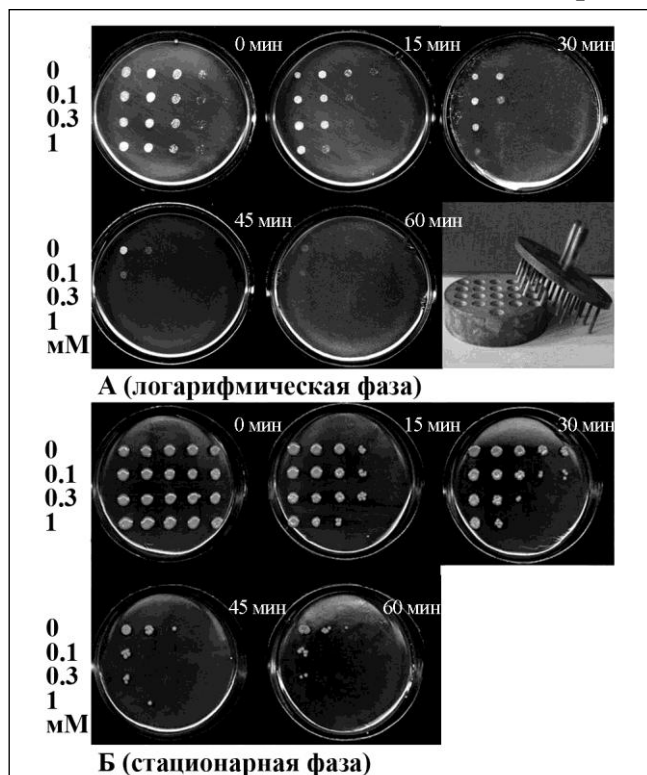


Рис. 2. Влияние монойодацетата (МИА) на термотолерантность *Sms* (штамм 5369).

Клетки *Sms* в логарифмической фазе роста (А) и стационарной фазе роста (Б) инкубировали при тепловом шоке (45°C) в течение 0, 15, 30, 45 и 60 минут в присутствии 0,1; 0,3; 1,0 мМ МИА. После последовательных разбавлений бактерии высевали на среду YPGA. По горизонтали слева направо представлены разведения бактериальной суспензии (в 10 раз; в 100 раз; в 1000 раз; в 10 000 раз). Термотолерантность *Sms* определяли по количеству КОЕ спустя 7 суток инкубации при 26°C. Представлены данные типичного эксперимента, n=3.

*Sms*, находящиеся в стационарной фазе, отличаются повышенной устойчивостью к МИА, тепловому шоку, а также к комбинированному воздействию этих двух факторов. Очевидно, что бактерицидный эффект используемых стрессоров зависит от интенсивности метаболизма в разные фазы роста бактерий. В логарифмической фазе бактериальные клетки активно утилизируют субстрат и делятся. В стационарной фазе прекращается деление клеток, накапливаются БТШ, антиоксидантные ферменты и другие стрессовые белки (Банакьян, 2003). Таким образом, бактерицидный эффект комбинированного действия МИА и теплового шока снижается при прекращении деления клеток. Вероятно, это объясняется тем, что МИА является инги-

1 ч (рис. 2, А). Скорость поглощения кислорода клетками *Sms* после такого теплового воздействия снижалась на 83% по сравнению с контролем.

Термотолерантность многих фитопатогенных бактерий зависит от фазы роста (Grondeau et al., 1994). Как показали результаты, в стационарной фазе роста бактерии *Sms* были более устойчивы к действию термообработки (рис. 2, Б). Таким образом, способность *Sms* переносить летальный тепловой шок зависит от фазы роста.

Изучение комбинированного действия МИА и теплового шока на жизнеспособность *Sms* показало, что тепловой шок значительно усиливал бактерицидный эффект МИА на клетки *Sms* в логарифмической фазе роста (рис. 2, А). Скорость поглощения кислорода клетками *Sms* при тепловом шоке в присутствии МИА снижалась на 93% по сравнению с контролем. Полная гибель бактерий наблюдалась через 45 и 60 мин обработки при 45°C в присутствии МИА (рис. 2, А). В то же время, бактерии в фазе стационарного роста оказались более устойчивы к совокупности неблагоприятных факторов (рис. 2, Б).

Таким образом, несмотря на то, что МИА быстро распадается при повышении температуры (Webb, 1963), тепловой шок значительно усиливает бактерицидное действие МИА. Клетки



битором триозофосфатдегидрогеназы, одного из ферментов гликолиза, а ингибирование гликолиза угнетает жизнеспособность растущих клеток, и незначительно ослабляет жизнеспособность клеток, которые закончили свое деление.

### 3.2. Эффект МИА и теплового шока на жизнеспособность картофеля

Поскольку МИА и тепловой шок 45°C обладают ярко выраженным бактерицидным эффектом на клетки *Cms* (рис. 1 и 2), необходимо было выяснить, как эти стрессовые воздействия повлияют на жизнеспособность картофеля.

Суспензионную культуру клеток картофеля обрабатывали при 26, 37 и 45°C в присутствии 1 мМ МИА. Эксперименты показали, что тепловое воздействие 37°C отрицательно не влияло на жизнеспособность суспензионной культуры, а обработка температурой 45°C снижала жизнеспособность на 70% (рис. 3). МИА при температуре 26 и 37°C заметно угнетал жизнеспособность клеток, а при температуре 45°C влияние МИА было не таким выраженным (рис. 3). Таким образом, было установлено, что стрессовые воздействия (45°C и 1 мМ МИА) угнетают жизнеспособность не только клеток *Cms*, но и суспензионной культуры клеток картофеля.

Двухнедельные растения картофеля *in vitro*, сорт Луговской, обрабатывали 1 ч при 26 и 45°C в присутствии 1 мМ МИА. Обработка МИА при 26°C не оказывала визуально заметного эффекта на рост растений по сравнению с контролем (рис. 4). Однако в конце срока наблюдения число желтых листьев в этом варианте было больше, чем в контроле (табл. 1).

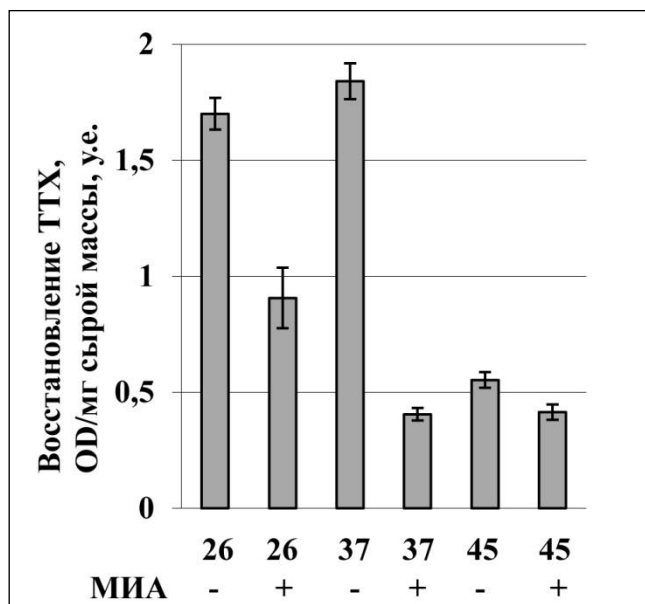


Рис. 3. Влияние термообработки и МИА на жизнеспособность суспензионной культуры картофеля сорта Лукьяновский.

Суспензионную культуру клеток картофеля обрабатывали МИА (1 мМ) при 37°C; 45°C, (1 ч). Жизнеспособность клеток картофеля определяли по интенсивности восстановления ТТХ. n=3. M±S.D.

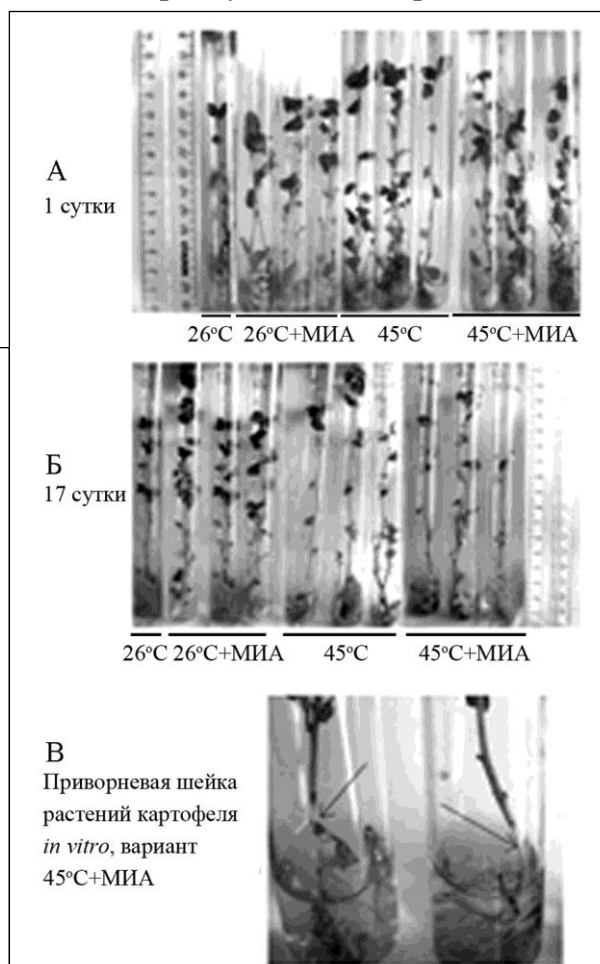


Рис. 4. Влияние теплового шока и МИА на жизнеспособность растений картофеля *in vitro* сорта Луговской.

Растения картофеля *in vitro* обрабатывали 1 мМ МИА при 45°C (1 ч). Культивировали 17 суток. Приведены данные типичного эксперимента, n=3.

Эффект воздействия температуры (45°C) выразался в утолщении стеблей и укрупнении листьев (рис. 4, Б). Эта обработка не оказывала негативного влияния на растения, о чем свидетельствует отсутствие желтых листьев в конце периода наблюдения (табл. 1).

Таблица 1. Влияние обработки МИА при 45°C на растения картофеля *in vitro* с. Луговской, 17 суток инкубации, n=12

Варианты обработки	Число желтых листьев, %
26°C	0
26°C+МИА	18 ± 2
45°C	0
45°C+МИА	51 ± 25

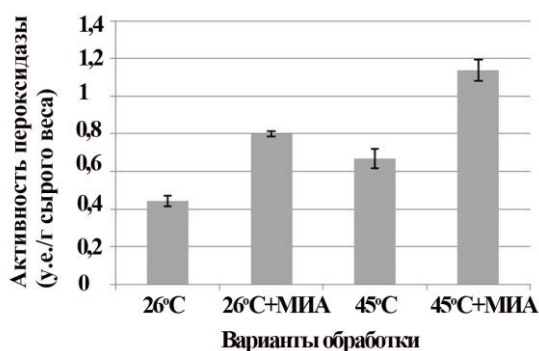


Рис. 5. Влияние обработки 1 мМ МИА при 45°C (1 ч) на активность общей пероксидазы картофеля *in vitro* сорта Луговской. Активность пероксидазы определяли через 17 суток культивирования, n=6. M±S.D.

Может служить активностью ферментов антиоксидантной защиты, например, такого фермента как пероксидаза (Савич, 1989). Известно, что активность этого фермента возрастает при поражении растений картофеля *Cms*, а также при тепловом шоке (Граскова, 2011). Спустя 17 суток после обработки активность пероксидазы повышалась как при обработке тепловым шоком, так и МИА. При комбинированном воздействии активность пероксидазы была максимальной (рис. 5).

Таким образом, наблюдается обратная зависимость между активностью пероксидазы и устойчивостью растений *in vitro*. Чем выше степень повреждения растений, тем выше активность пероксидазы.

Для изучения эффекта МИА и теплового шока на прорастание клубней картофеля использовали семенной материал картофеля на различных стадиях хранения. Клубни погружали в раствор 1 мМ МИА, затем выдерживали 1 ч при 45°C. Исследования показали отсутствие какого-либо влияния обработки на клубни. Не обнаружено статистически значимых различий между контрольными и опытными клубнями: ни по количеству, ни по длине, ни по массе проростков (табл. 2).

Тепловой шок значительно усиливал отрицательный эффект обработки МИА на растения. Растения имели истонченный, искривленный стебель, листья завядали. На 17 суток инкубации отрицательный эффект обработки был максимальным (рис. 4, Б), число желтых листьев достигало 51% (таб. 1). Иногда наблюдалось истончение прикорневой шейки (рис. 4, В).

Таким образом, отрицательный эффект комбинированного воздействия МИА и теплового шока на жизнеспособность проявляется не только в отношении патогенных бактерий, но и активно делящихся клеток суспензионной культуры и растений картофеля *in vitro*. В отличие от клеток *Cms* и суспензионной культуры, не наблюдалось ярко выраженного отрицательного эффекта теплового шока 45°C на картофель *in vitro*, а обработка МИА при 26°C оказывала слабый негативный эффект.

Маркером стрессового состояния

Таблица 2. Влияние обработки 1 мМ МИА при 37, 45°С (1 ч) на количество, длину и массу проростков картофеля (эксперименты проведены в марте 2010 г. и 2011 г.) n=10. М±S.D.

Вариант	Среднее количество проростков, шт.	Средняя длина проростка, см	Средняя масса проростков, г.
Лукьяновский 26°С	8,3±2,2	1,1±0,3	1±0,3
Лукьяновский 26°С + МИА	10,3±2	1,5±0,3	1,8±0,6
Лукьяновский 37°С	8±1,3	2,1±0,4	2±0,6
Лукьяновский 37°С + МИА	8,3±2,2	1,8±0,5	2±0,3
Лукьяновский 45°С	10,5±3	1,1±0,3	1,1±0,4
Лукьяновский 45°С + МИА	10,2±2,2	1±0,3	0,9±0,7
Луговской 26°С	7,7±1,8	1,9±0,6	2,3±1,3
Луговской 26°С + МИА	7,5±2,5	1,6±0,3	1,9±0,7
Луговской 37°С	6±2,2	1,7±0,4	2±1,2
Луговской 37°С + МИА	6,3±1,7	1,9±0,3	2,2±0,7
Луговской 45°С	8,5±2,1	1,7±0,3	2,1±0,5
Луговской 45°С + МИА	7,6±2,1	0,7±0,2	0,7±0,5

Таким образом, МИА угнетает клетки с активным метаболизмом: клетки *Sms* в логарифмической фазе роста, суспензионную культуру клеток картофеля, растения картофеля *in vitro*, но не оказывает отрицательного влияния на клубни картофеля.

### 3.3. Эффект МИА и теплового шока на продуктивность картофеля в вегетационном опыте

Вегетационные опыты проводили в 2009 г. и 2011 г. Клубни заражали *Sms*, подвергали тепловому шоку 45°С, затем высаживали в сосуды с почвой. В конце вегетации (90 суток) у зараженных растений восприимчивого сорта без термической обработки проявлялись явные симптомы заболевания (вилт, пожелтение листьев). В 2009 г. зараженные клубни сорта Лукьяновский не отличались по продуктивности от контрольных, но в 2011 г. наблюдалось снижение продуктивности более чем на 50 % (рис. 6). Заражение клубней сорта Луговской не вызывало видимых признаков заболевания. Результаты показали некоторое повышение продуктивности у этого сорта при инфицировании *Sms*. Полученные результаты подтверждают данные других исследователей (Romanenko et al., 1999; Граскова, 2011), которые показали, что заражение *Sms* растений картофеля *in vitro* сорта Луговской на 20% стимулировало их рост.

Однако анализ клубней экспериментальных растений показал, что спустя 8 месяцев хранения (апрель 2012 г.) заражение *Sms* вызывает типичное проявление симптомов заболевания (кольцевое поражение сосудистого пучка) как у клубней восприимчивого сорта, так и у устойчивого. Следовательно, несмотря на то, что заражение *Sms* не приводило к вилту и пожелтению листьев у сорта Луговской, и даже повышало его продуктивность (рис. 6), бактерии проникали в клубни и вызывали их поражение во время хранения. Полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что отсутствуют сорта картофеля абсолютно устойчивые к *Sms*, различия между сортами могут наблюдаться только в скорости проявления симптомов заболевания (Eichenlaub, Gartemann, 2011). Очевидно, что длительность латентной стадии имеет сортовую специфику.

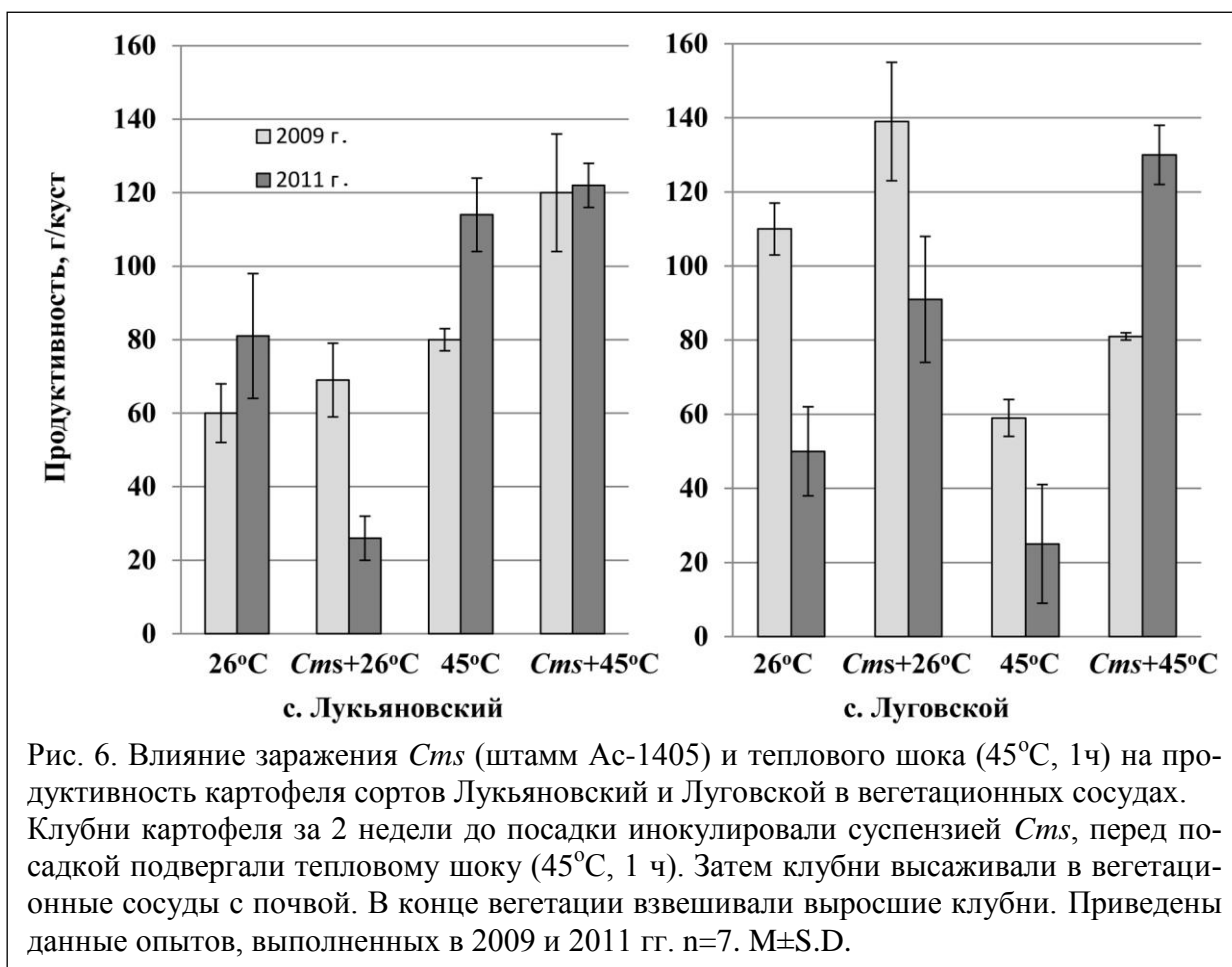


Рис. 6. Влияние заражения *Cms* (штамм Ас-1405) и теплового шока (45°C, 1ч) на продуктивность картофеля сортов Лукьяновский и Луговской в вегетационных сосудах. Клубни картофеля за 2 недели до посадки инокулировали суспензией *Cms*, перед посадкой подвергали тепловому шоку (45°C, 1 ч). Затем клубни высаживали в вегетационные сосуды с почвой. В конце вегетации взвешивали выросшие клубни. Приведены данные опытов, выполненных в 2009 и 2011 гг. n=7. M±S.D.

Предпосадочная тепловая обработка клубней 45°C оказывала стимулирующий эффект на незараженные растения сорта Лукьяновский. Это выражалось в интенсивной окраске листьев, утолщении стеблей и в повышении продуктивности. У устойчивого сорта Луговской тепловой шок понижал продуктивность (рис. 6, вариант 45°C).

Тепловая обработка 45°C зараженных клубней сдерживала проявление внешних признаков инфекции у выросших из них растений восприимчивого сорта Лукьяновский и повышала их продуктивность (рис. 6, вариант *Cms*+45°C). Анализ клубней спустя 8 месяцев хранения показал наличие ярко выраженных симптомов заболевания в варианте *Cms*+45°C. Таким образом, несмотря на то, что обработка 45°C повышала устойчивость и продуктивность зараженных растений картофеля сорта Лукьяновский, клубни, полученные из этих растений, были не пригодны для длительного хранения.

У растений устойчивого сорта Луговской в варианте *Cms*+45°C симптомов заболевания не отмечалось. Согласно данным за два года наблюдений заражение растений снимало неблагоприятный эффект теплового шока на продуктивность (рис. 6, вариант *Cms*+45°C).

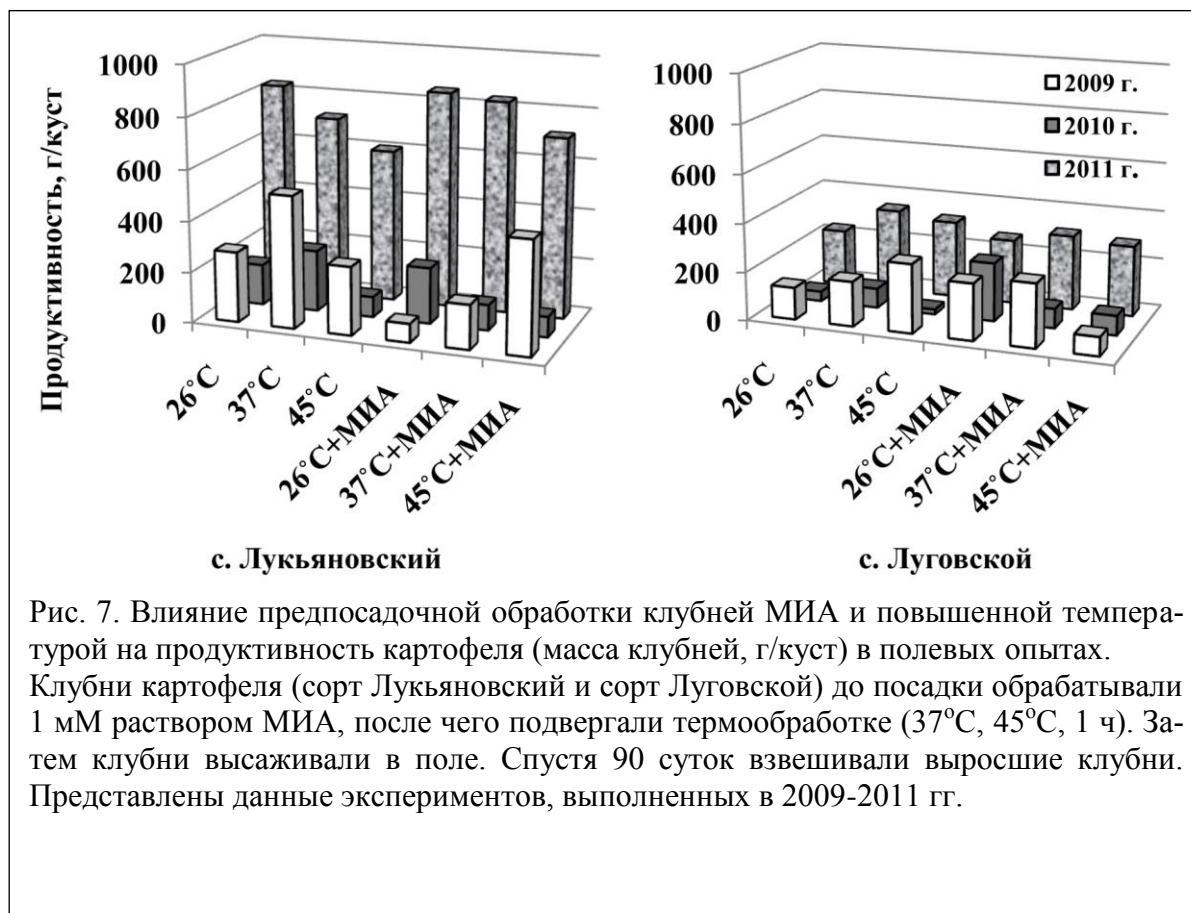
Таким образом, результаты вегетационного опыта позволяют предполагать, что на ранних стадиях инфекции *Cms* может стимулировать рост растений. В этом случае развитие симптомов заболевания происходит на более поздней стадии при хранении клубней. Очевидно, что предварительная тепловая обработка (45°C) клубней может только замедлять проявление симптомов заболевания на ранней стадии. Полученные результаты подтверждают положение, согласно которому нет

четкой границы между патогенезом и мутуализмом (Rodriguez, Redman, 2008; Kobayashi, Crouch, 2009).

### 3.4. Эффект МИА и теплового воздействия на продуктивность картофеля в полевом опыте

*Cms* является карантинным организмом во многих странах (Калач и др., 2010), поэтому не допустимо использовать зараженные клубни в полевых экспериментах. В сезонах 2009-2011 гг. изучали, как предварительное тепловое воздействие и МИА повлияют на вегетацию и продуктивность картофеля в полевых условиях. Результаты показали, что предварительная обработка МИА и повышенной температурой клубней сорта Лукьяновский не приводила к какому-либо ярко выраженному эффекту (рис. 7). Продуктивность в каждом варианте эксперимента значительно изменялась от сезона к сезону.

Иная ситуация наблюдалась в случае сорта Луговской (рис. 7). В течение трех лет эксперимента клубни картофеля, обработанные при 37°C, давали растения с более высокой продуктивностью. Аналогичное повышение продуктивности наблюдалось у растений сорта Луговской, клубни которых были обработаны МИА при 26°C. Таким образом, предпосадочная обработка МИА как при обычной температуре, так и в комбинации с термообработкой не имеет негативного эффекта на продуктивность картофеля, но даже способна ее повышать. Поскольку МИА обладает сильным летальным эффектом в отношении *Cms*, а также дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Рымарева и др., 2008) и не имеет отрицательного влияния на продуктивность, можно предполагать, что этот агент способен обладать широким спектром бактерицидного и фунгицидного действия и безопасен для растений при обработке клубней. Отсутствие стимулирующего эффекта обработки МИА на продуктивность сорта Лукьяновский, вероятно, можно объяснить тем, что при обра-

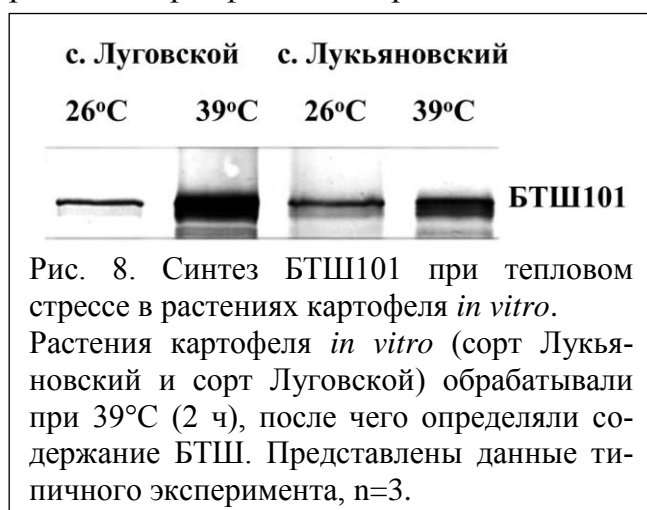


ботке МИА клубней картофеля восприимчивого сорта следует использовать другую концентрацию агента и время обработки. Так, показано, что обработка семян растений семейства крестоцветных при 40°C ацетатом меди в растворе уксусной кислоты приводила к избавлению от *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, но эффективность обработки различалась в зависимости от сорта (Grondeau et al., 1994).

Что же касается термической обработки, то направленность ее эффекта, как показали результаты вегетационного и полевого опытов, во многом зависела от условий выращивания растений картофеля того или иного сорта.

### 3.5. Синтез БТШ у растений картофеля *in vitro*

В вышеописанных экспериментах использовали тепловой шок 45°C, который снижает жизнеспособность бактерий и метаболически активных клеток растений. Известно, что при мягком тепловом стрессе синтезируются белки теплового шока БТШ (Wang et al., 2004), которые защищают клетку от гибели при более жестком тепловом шоке (Wahid et al., 2007). В ряде случаев БТШ индуцируются при вторжении патогенов в растения и при обработке элиситорами (Maimbo et al., 2007; Duan et al., 2011). В тоже время отсутствует информация о роли БТШ в ответной реакции картофеля на вторжение *Cms*.



БТШ101 – наиболее важный защитный белок при тепловом шоке (Singh et al., 2010). Предварительные эксперименты показали, что наибольшая индукция этого белка в растениях картофеля *in vitro* наблюдается при 39°C. Как видно из рис. 8, каких-либо различий в конститутивном синтезе данного белка при 26°C у восприимчивого и устойчивого сортов картофеля не обнаружено. Поэтому относительная устойчивость сорта Луговской к заражению *Cms* не связана с повышением уровня синтеза БТШ101.

Обработка растений при 39°C (2 ч) приводила к значительному увеличению содержания этого белка у обоих сортов (рис. 8).

### 3.6. Эффект теплового стресса 39°C и МИА на колонизацию *Cms* растений картофеля *in vitro*

Чтобы изучить роль теплового стресса при взаимодействии растений картофеля с патогеном, была определена динамика проникновения *Cms* в растения *in vitro*. Исследования показали, что спустя первые сутки коинкубации бактерии проникали в корневую и стеблевую зоны растений обоих сортов. На вторые сутки у растений сорта Луговской бактерии обнаруживались преимущественно в корневой зоне. У сорта Лукьяновский отмечали колонизацию патогеном всего растения. Полученные данные подтверждают результаты И.А. Грасковой, согласно которым проникновение *Cms* по тканям картофеля устойчивого сорта происходит менее интенсивно, чем восприимчивого сорта (Граскова, 2011).

Ранее, в клетках растений картофеля были выявлены рецепторы, специфичные к экзополисахаридам *Cms*, и показано их преобладающее количество в клеточных стенках и на плазмалемме клеток растений картофеля восприимчивого сорта (Рымарева, 2001; Шафикова., 2003). Согласно данным А.С. Романенко, в разных сортах картофеля осуществляется различная стратегия защиты от бактериального

патогена. У устойчивого сорта она связана с наличием в клеточных стенках и на плазмалемме небольшого, но достаточного количества рецепторов к экзометаболитам патогена, необходимым для восприятия и быстрого формирования защитных ответов с участием сигнальных систем, в частности, аденилатциклазной и НАДФ-оксидазной сигнальных систем (Romanenko et al., 2003). Известно, что у картофеля устойчивого сорта конститутивно более высокий уровень антиоксидантных ферментов, в частности пероксидазы, а синтез таковых у картофеля восприимчивого сорта начинается только после стресса (Граскова, 2011).

Тепловой стресс 39°C значительно усиливал эффективность проникновения *Sms* в растения картофеля (рис. 9). В растениях восприимчивого сорта повышение КОЕ *Sms* после обработки 39°C наблюдалось во всех зонах. В растениях устойчивого сорта тепловая обработка усиливала проникновение *Sms* в верхушечной и стеблевой зонах. Следовательно, тепловое воздействие (39°C), которое само по себе не повреждает растение, индуцирует синтез БТШ (рис. 8), не только не препятствует проникновению патогена в растения картофеля, но и значительно его стимулирует.

Есть основания полагать, что взаимодействие патогенных микроорганизмов с растениями зависит от активности митохондрий. Показано, что при биотическом стрессе может наблюдаться повышение интенсивности дыхания и изменение потенциала на внутренней митохондриальной мембране (Vidal et al., 2007; Krause, Durner, 2004). Поэтому на следующем этапе был изучен эффект МИА, который ингибирует дыхание (Варакина, 1971). Обработка 1 мМ МИА при 26°C значительно усиливала проникновение *Sms* в растения картофеля *in vitro* обоих сортов (рис. 9, Б). Следовательно, несмотря на то, что обработка МИА клубней картофеля сорта Луговской стимулирует продуктивность в полевом эксперименте, обработка МИА растений картофеля *in vitro* значительно усиливает проникновение патогенных

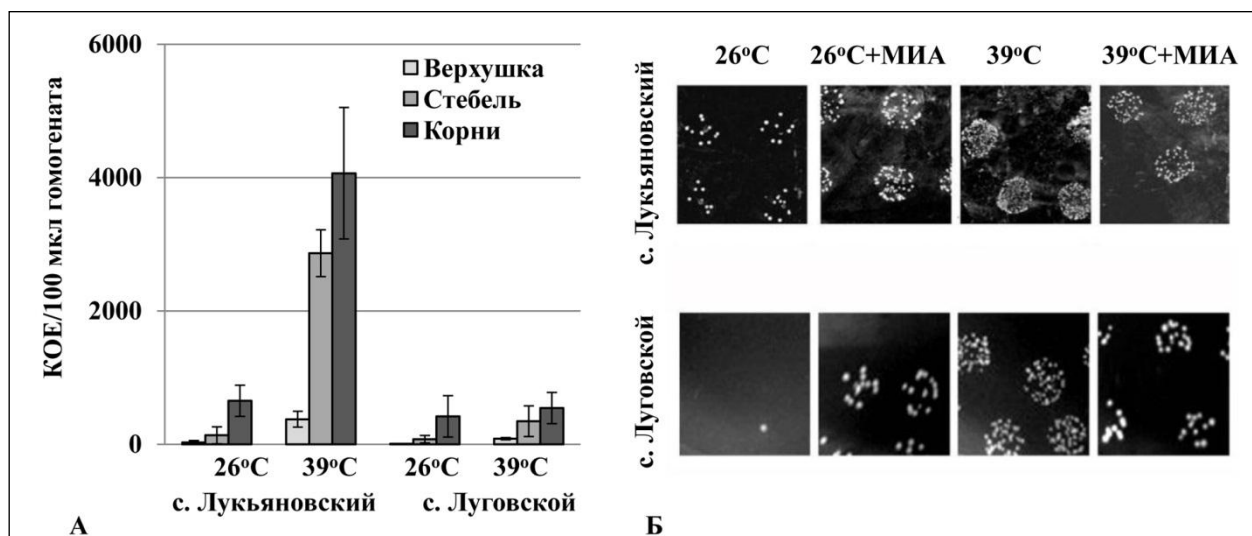


Рис. 9. Влияние обработки МИА при 39°C на колонизацию *Sms* (штамм Ас-1405) картофеля *in vitro*.

(А) В среду роста растений картофеля *in vitro* (сорт Лукьяновский и сорт Луговской) добавляли 1 мМ раствор МИА, выдерживали 1 ч, после чего обрабатывали при 39°C (2 ч). Затем растения отмывали от МИА и инокулировали *Sms*. Спустя 2 суток культивирования производили высев гомогената, полученного из зон растения (верхушка, стебель, корни). (Б) Графическое представление полученных данных. Интенсивность колонизации определяли по количеству КОЕ. n=3-5. M±S.D.

бактерий в растение-хозяина. Токсическое действие на патогены многих пестицидов, используемых в сельском хозяйстве, определяется их способностью ингибировать дыхательную цепь переноса электронов (Анисимов и др., 2009; Legoux et al., 2010). Вероятно, дыхательные яды могут оказывать побочный эффект. Обработка ими посадочного материала обеззараживает его, но действие этих агентов на вегетирующие растения может подавлять активность митохондрий, а значит стимулировать проникновение патогена в растение.

Несмотря на то, что тепловой шок и МИА по отдельности усиливали проникновение патогена в растения картофеля *in vitro*, синергического действия этих двух стрессоров при совместном действии теплового шока и МИА не наблюдалось. МИА в сочетании с термической обработкой при 39°C несколько снижал эффективность колонизации растений при тепловом стрессе (рис. 9). Таким образом, эффект МИА на взаимодействие растений и *Cms* не однозначен. Вероятно, отсутствие синергического эффекта на проникновение *Cms* в растения при одновременной обработке МИА и высокими температурами обусловлено снижением стабильности МИА.

Предположительно, феномен повышения эффективности проникновения *Cms* в растения картофеля *in vitro* при тепловом стрессе может быть связан с повышением синтеза при тепловом воздействии у *Cms* ее установленных факторов вирулентности – сериновой протеазы и целлюлазы (Eichenlaub, Gartemann, 2011). Также возможно, что тепловой стресс блокирует активацию экспрессии защитных генов картофеля, которые обычно активизируются при биотическом стрессе, что приводит к усилению колонизации.

### **3.7. Эффект заражения *Cms* и обработки МИА на способность растений индуцировать синтез БТШ**

Растения картофеля *in vitro* заражали *Cms* и после двух суток инкубации при 26°C подвергали тепловому стрессу 39°C (2 ч) и анализировали изменение в уровне синтеза БТШ101 и БТШ17,6. В контрольных растениях, не подверженных действию теплового стресса и заражения, синтез исследуемых белков был незначительным (рис. 10). Тепловая обработка 39°C индуцировала синтез БТШ101 и БТШ17,6.

Заражение *Cms* растений картофеля *in vitro* влияло на индукцию синтеза БТШ у восприимчивого и устойчивого сортов различным образом. В растениях сорта Лукьяновский заражение индуцировало синтез БТШ, а у сорта Луговской, наоборот, подавляло. Согласно литературным данным, бактериальный элиситор харпин активировал экспрессию ряда генов БТШ у клеток *A. thaliana*. Однако активация экспрессии имела временный характер. Активация наблюдалась через 30 мин обработки, а через 4 ч, наоборот, экспрессия снижалась ниже контрольного уровня (Krause, Durner, 2004). Можно предположить, что аналогичное явление наблюдается и в растениях картофеля *in vitro* при заражении *Cms*. Поэтому динамика изменения уровня БТШ имеет различный характер у устойчивого и восприимчивого сортов. Заражение растений устойчивого сорта подавляло их способность синтезировать БТШ, а у восприимчивого сорта этот эффект был слабо выражен (рис. 10).

Поскольку обработка МИА при 26°C усиливала проникновение патогена в растения картофеля (рис. 9), необходимо было проверить, связан ли этот процесс с синтезом БТШ.



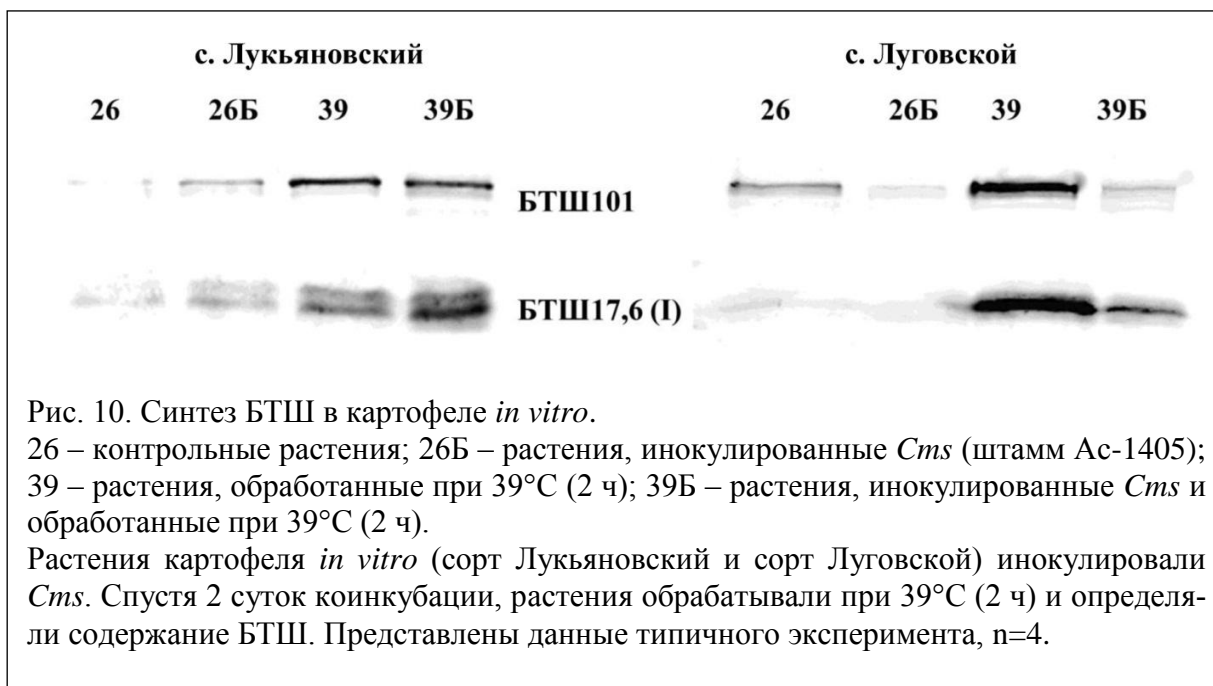


Рис. 10. Синтез БТШ в картофеле *in vitro*.

26 – контрольные растения; 26Б – растения, инокулированные *Sms* (штамм Ас-1405); 39 – растения, обработанные при 39°C (2 ч); 39Б – растения, инокулированные *Sms* и обработанные при 39°C (2 ч).

Растения картофеля *in vitro* (сорт Лукьяновский и сорт Луговской) инокулировали *Sms*. Спустя 2 суток коинкубации, растения обрабатывали при 39°C (2 ч) и определяли содержание БТШ. Представлены данные типичного эксперимента, n=4.

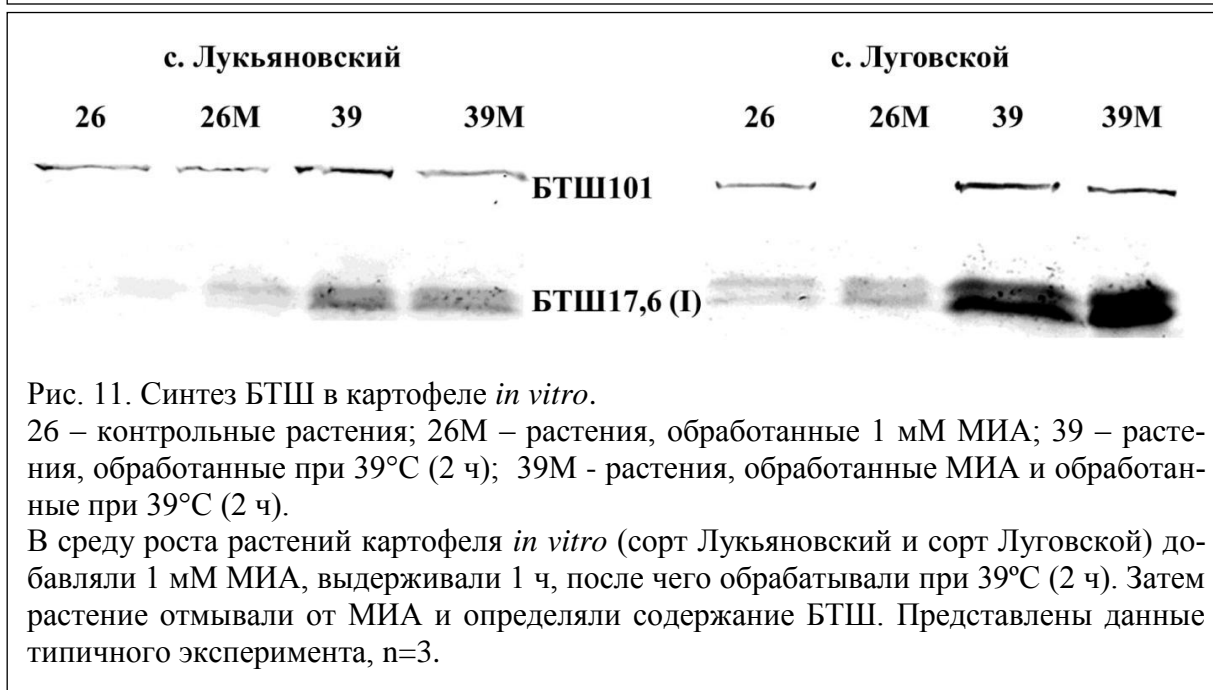


Рис. 11. Синтез БТШ в картофеле *in vitro*.

26 – контрольные растения; 26М – растения, обработанные 1 мМ МИА; 39 – растения, обработанные при 39°C (2 ч); 39М - растения, обработанные МИА и обработанные при 39°C (2 ч).

В среду роста растений картофеля *in vitro* (сорт Лукьяновский и сорт Луговской) добавляли 1 мМ МИА, выдерживали 1 ч, после чего обрабатывали при 39°C (2 ч). Затем растение отмывали от МИА и определяли содержание БТШ. Представлены данные типичного эксперимента, n=3.

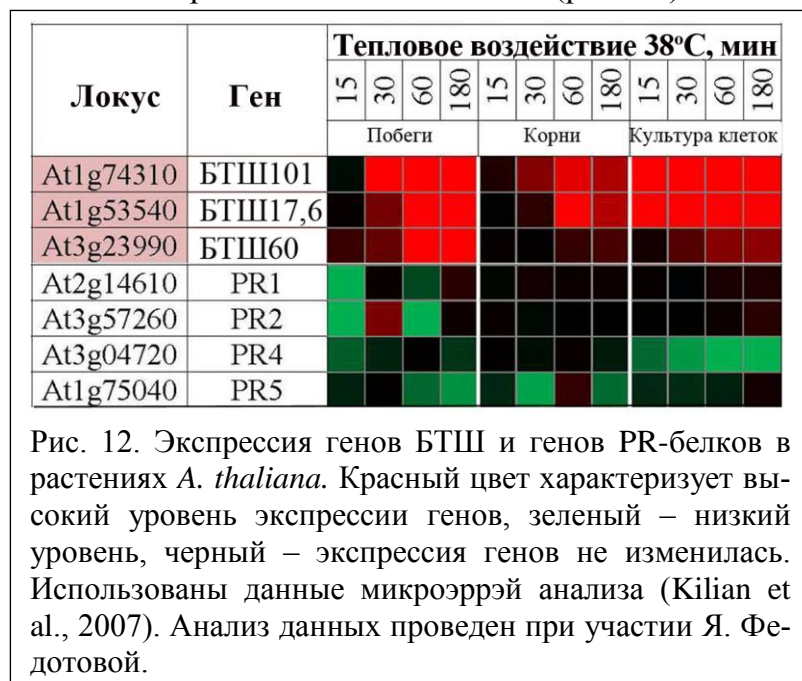
Растения обрабатывали 1 мМ МИА, в течение 1 ч, затем подвергали тепловому стрессу 39°C (2 ч). Как видно на рис. 11, обработка МИА понижала экспрессию БТШ101 как при 26°C, так и при 39°C. Таким образом, можно сделать вывод, что усиление колонизации *Sms* растений при обработке МИА не связано с индукцией синтеза БТШ. Растение становится более восприимчивым к колонизации после обработки МИА вследствие нарушения других метаболических процессов клеток растения.

### 3.8. Биоинформационный анализ экспрессии генов БТШ и генов PR-белков в *A. thaliana*

Стимулирующий эффект теплового стресса на колонизацию бактериями картофеля *in vitro*, а также подавление индукции синтеза БТШ у зараженных растений картофеля устойчивого сорта позволило предположить, что активация защитной

программы в ответ на тепловой стресс находится в обратной зависимости от активации защитной программы в ответ на биотическое воздействие.

При биотическом стрессе синтезируются PR-белки (Малиновский, 2010). Биоинформационный анализ экспрессии генов арабидопсиса, полученный Kilian et al. (2007), с использованием базы данных AtGenExpress показал, что активация экспрессии генов БТШ при тепловом стрессе, как правило, сопровождается подавлением экспрессии генов PR-белков (рис. 12).



Этот результат подтверждает предположение, что в условиях, когда развивается устойчивость к тепловому шоку, устойчивость к биотическому стрессу снижается. Таким образом, повышение эффективности колонизации растений *Sms* при тепловом стрессе, вероятно, объясняется тем, что повышение температуры подавляет экспрессию защитных генов картофеля, активируемых в ответ на биотический стресс.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день мало изучено действие стрессовых факторов на жизнеспособность *Sms*. Обработка МИА оказывала значительный бактерицидный эффект на клетки *Sms* (рис. 1). Гибель клеток *Sms* еще больше усиливалась, если клетки обрабатывали МИА в комбинации с тепловым шоком (45°C) (рис. 2). Возможно, такое действие связано с денатурацией и агрегацией клеточных белков, нарушением липидного состава мембран и повреждением структуры ДНК, а также с повышением продукции АФК (Vabulas, et al., 2010). Показано, что тепловой шок (45°C) приводит к повышению уровня АФК в клетках *S. cerevisiae* (Rikhvanov et al., 2005). Также губительный эффект МИА и теплового шока на *Sms* можно объяснить тем, что МИА ингибирует продукцию АТФ (Lash et al., 1996; Beltran et al., 2000). Бактерицидный эффект МИА и теплового шока в отношении *Sms* зависел от фазы роста. Клетки *Sms* в стационарной фазе роста были более устойчивы как к МИА (рис. 1) и тепловому шоку, так и к совместному действию этих двух факторов (рис. 2). Эти данные подтверждаются литературными сведениями о том, что термотолерантность *E. coli* (Diaz-Acosta et al., 2006) и дрожжей *Yarrowia lipolytica* (Бирюкова и др., 2007) повышается в стационарной фазе роста. Такой эффект объясняют накоплением БТШ, антиоксидантных ферментов и других стрессовых белков в прекративших деление клетках (Банакьян, 2003).

Эффект влияния губительных для бактерий обработок (МИА и тепловой шок 45°C) был проверен на хозяине данного патогена – картофеле. Было показано, что комбинированная обработка подавляла жизнеспособность активно функционирующих клеток суспензионной культуры картофеля (рис. 3) и растений картофеля

*in vitro* (рис. 4, табл. 1). Однако отрицательного действия МИА и теплового шока на прорастание клубней не было обнаружено (табл. 2). Таким образом, комбинированная обработка МИА в условиях теплового шока оказывает выраженный токсический эффект как на прокариоты, так и эукариоты, находящиеся в процессе роста и развития, но значительно меньше влияет на организмы, которые находятся в состоянии покоя.

Результаты полевых опытов показали, что обработка клубней МИА как совместно с тепловым шоком, так и без него не имела негативного эффекта на продуктивность картофеля и даже в некоторых случаях могла стимулировать ее, например, у сорта Луговской (рис. 7). Полученные в настоящей работе результаты и данные предыдущих исследований (Рымарева и др., 2008) указывают на то, что МИА обладает сильным бактерицидным и фунгицидным эффектом и может быть использован против широкого круга патогенов.

Тепловой шок усиливает губительный эффект МИА на жизнеспособность клеток *Sms*. Аналогичным образом дыхательные яды снижали термотолерантность дрожжей (Rikhvanov et al., 2002). Можно предполагать, что применение уже используемых пестицидов совместно с тепловым шоком приведет к повышению эффективности обеззараживания посадочного материала и позволит снизить действующие концентрации агентов. Таким образом, сведения, полученные в настоящей работе, могут быть использованы для оптимизации предпосевной обработки посадочного материала.

Предпосадочная термическая обработка зараженных клубней картофеля снимала симптомы заболевания у сорта Лукьяновский на стадии вегетации. Однако это не приводило к полному обеззараживанию клубней. Термообработка повышала устойчивость растений к инфекции на стадии вегетации, но не предотвращала поражение вновь образованных клубней *Sms* на стадии хранения.

Тепловой стресс 39°C приводил к индукции синтеза БТШ101 (рис. 8) и значительно усиливал эффективность проникновения *Sms* в растения картофеля (рис. 9). Следовательно, тепловое воздействие, которое само по себе не повреждает растение и защищает его от гибели при жестком тепловом шоке, не только не препятствует проникновению патогена в растения картофеля, но и значительно его стимулирует.

Обработка МИА при обычной температуре инкубации, так же как и тепловой стресс 39°C, значительно усиливала проникновение *Sms* в растения *in vitro* обоих сортов картофеля (рис. 9). Это обстоятельство вводит определенные ограничения на возможность использования МИА в сельскохозяйственной практике. Полученные результаты указывают, что используемые в настоящее время дыхательные яды могут иметь побочный эффект: оказывая токсичное действие на патоген, они могут подавлять активность митохондрий растений, а значит стимулировать проникновение патогена в растение-хозяина.

Способность МИА стимулировать проникновение *Sms* в растения указывает на то, что функционирование митохондрий имеет большое значение при взаимодействии патогена с растением картофеля. Есть основания полагать, что взаимодействие патогенных микроорганизмов с табаком (Vidal et al., 2007) и арабидопсисом (Krause, Durner, 2004) также зависит от активности митохондрий растительной клетки.

Стимулирующий эффект теплового стресса на колонизацию бактериями картофеля *in vitro*, а также подавление индукции синтеза БТШ у зараженных растений

устойчивого сорта (рис. 10) позволило предположить, что активация защитной программы в ответ на тепловой стресс находится в обратной зависимости к активации защитной программы в ответ на биотическое воздействие. Биоинформационный анализ показал, что при тепловом стрессе (38°C) происходит активация экспрессии генов БТШ в *A. thaliana*. Одновременно уменьшается экспрессия генов, кодирующих PR-белки (рис. 12), что, по-видимому, снижает способность растений противостоять вторжению патогена.

Заражение *Cms* растений картофеля *in vitro* различным образом влияло на индукцию синтеза БТШ в растениях восприимчивого и устойчивого сортов. У восприимчивого сорта при заражении *Cms* индуцировался синтез БТШ, у устойчивого сорта, наоборот, синтез БТШ подавлялся (рис. 10). Из литературы известно, что экспрессия генов БТШ имеет временную динамику при биотическом стрессе (Krause, Durner, 2004). По-видимому, различная динамика изменения уровня БТШ в растениях картофеля при взаимодействии с *Cms* имеет сортоспецифичный характер.

## 5. ВЫВОДЫ

1. Обработка МИА оказывает бактерицидный эффект на клетки *Cms*. Повреждающий эффект МИА усиливается при тепловом шоке. Клетки *Cms*, находящиеся в стационарной фазе, отличаются повышенной устойчивостью к МИА, тепловому шоку, а также к комбинированному воздействию этих двух факторов.

2. Обработка МИА в сочетании с тепловым шоком снижает жизнеспособность культуры клеток картофеля и растений картофеля *in vitro*, но не имеет отрицательного влияния на прорастание клубней картофеля.

3. Обработка МИА и тепловым шоком клубней картофеля не имеет отрицательного влияния на продуктивность картофеля в полевом эксперименте. Обработка МИА повышает продуктивность сорта Луговской.

4. Тепловой шок (45°C) замедляет проявление симптомов заболевания кольцевой гнилью у картофеля на стадии вегетации, но усиливает поражение клубней на стадии хранения.

5. Усиление проникновения *Cms* в растения картофеля *in vitro* происходит при тепловом стрессе (39°C), который индуцирует синтез БТШ101 и БТШ17,6, а также при обработке МИА при 26°C.

6. Заражение *Cms* растений картофеля *in vitro* сорта Луговской подавляло их способность индуцировать синтез БТШ при тепловом стрессе.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Перфильева А.И., Рымарева Е.В., Живетьев М.А. Изменение ферментативной активности, устойчивости и продуктивности растений картофеля при термическом и химическом воздействии // Известия ИГУ. Серия: Биология, Экология. - 2011. - Т. 4, № 1, - С.3-13.

2. Перфильева А.И., Рымарева Е.В. Влияние температуры и моноидоацетата на жизнеспособность картофеля *in vitro*// Вестник ИрГСХА. - 2011. - № 43. С.18-28.

3. Перфильева А.И., Рымарева Е.В. Влияние гипертермии на распространение возбудителя кольцевой гнили по растениям картофеля *in vitro* // Вестник ИрГСХА. - 2011. - № 46. - С.30-36.

4. Перфильева А.И., Рымарева Е.В. Проблема бактериальных заболеваний при озеленении городов // Материалы международной конференции «Проблемы

озеленения городов Сибири и сопредельных территорий», Иркутск. Вестник ИрГСХА. - 2011. - № 44 (5). - С.81-85.

5. Перфильева А.И., Рымарева Е.В., Рихванов Е.Г. Эффект гипертермии и моноиодацетата на продуктивность картофеля в вегетационных и полевых экспериментах // *Агрохимия*. - 2012. (в печати).

6. Перфильева А.И., Живетьев М.А., Рымарева Е.В., Папкина А.В. Влияние гипертермии и заражения на активность общей пероксидазы картофеля двух сортов, контрастных по устойчивости к *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. - 2012. - Vol. 8, № 1. – P. 48-57.

7. Перфильева А.И., Рымарева Е.В., Шевцов Д.А., Рихванов Е.Г. Влияние гипертермии и моноиодацетата на развитие симптомов кольцевой гнили и вегетацию картофеля, выращенного в естественных условиях // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. - 2012. - Vol. 8, 1. - P. 126-137.

8. Рымарева Е.В., Рихванов Е.Г., Торгашина М.А., Перфильева А.И., Копытчук В.Н., Варакина Н.Н. Влияние моноиодацетата на термотолерантность *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. - 2008. - Vol. 4, № 2. - P. 4-13.

9. Перфильева А.И. Влияние различной обработки картофеля на симптомы кольцевой гнили // LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH&Co. KG, Germany. - 2012. - 97 с.

10. Рымарева Е.В., Перфильева А.И., Рихванов Е.Г., Копытчук В.Н. Влияние моноиодацетата на термотолерантность возбудителя кольцевой гнили картофеля // *Материалы Всероссийской научной конференции «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды»*, Иркутск, 2007. - С.236-239.

11. Перфильева А.И., Рымарева Е.В., Копытчук В.Н. Влияние моноиодацетата и теплового шока на выживаемость возбудителя кольцевой гнили картофеля // *Материалы научно-теоретической конференции ИГУ, журнал «Вестник ИГУ»*, Иркутск, 2008. - С. 36-37.

12. Рымарева Е.В., Перфильева А.И., Рихванов Е.Г., Копытчук В.Н., Варакина Н.Н. Влияние моноиодацетата и теплового шока на выживаемость возбудителя кольцевой гнили картофеля // *Материалы Международной научно-практической конференции «Проблемы современного картофелеводства»*, Минск, 2008. - С. 328-331.

13. Рымарева Е.В., Перфильева А.И., Рихванов Е.Г., Копытчук В.Н. Комбинированное действие термообработки и моноиодацетата на обеззараживание клубней картофеля // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Пищевые технологии, качество и безопасность продуктов питания»*, Иркутск. - С. 42-45.

14. Перфильева А.И., Рымарева Е.В., Рихванов Е.Г., Раченко Е.И. Влияние термообработки и МИА на жизнеспособность картофеля и возбудителя кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* // *Материалы Всероссийской научной конференции «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды»*, Иркутск, 2009. - С. 367-370.

15. Перфильева А.И., Рымарева Е.В. Распространение *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* по растению картофеля *in vitro* // *Материалы Всероссийский симпозиум физиологов растений «Растение и стресс»*, Москва, 2010. - С. 237-374.

16. Перфильева А.И., Рымарева Е.В. Комбинированное действие термообработки и моноодацетата на обеззараживание клубней картофеля // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 80-летию ИрГТУ, Иркутск, 2010. - С.11-16.

17. Перфильева А.И., Рымарева Е.В. Проблема защиты картофеля от возбудителя кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* // Материалы заочной II Научно-практической конференции с международным участием «Эколого-биологические проблемы Сибири и сопредельных территорий», Нижневартовск, 2011. - С. 137-139.

18. Перфильева А.И. Аномальная жара и урожайность картофеля // Материалы Международной научно-практической заочной конференции «Современные изменения климата: социальные, экономические и экологические последствия», Чебоксары, 2011. - С. 167-169.

19. Перфильева А.И., Рымарева Е.В., Рихванов Е.Г. Влияние предпосадочной термообработки на жизнеспособность и урожайность картофеля // Материалы Всероссийского съезда общества физиологов растений России, Нижний Новгород, 2011. - С.540-541.

20. Перфильева А.И., Рымарева Е.В., Рихванов Е.Г. Влияние предпосадочной термообработки и заражения на жизнеспособность и урожайность картофеля // Материалы Всероссийского съезда общества физиологов растений России, Нижний Новгород, 2011. - С.541-542.