

ORIGINAL ARTICLE

**THE INFLUENCE OF MONOIODACETATE ON THE THERMOTOLERANCE
OF *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* AND
*SACHAROMYCES CEREVISIAE***

Rymareva E.V., Rikhvanov E.G., Torgashina M.A., Perfileva A.I.,
Kopytchuk V.N., Varakina N.N.

*Siberian Institute of Plant Physiology & Biochemistry SD RAS. 664033, Irkutsk, POBox 317,
Lermontov st., 132, Russia*

e-mail: elenar@sifibr.irk.ru

Received March 30, 2008

Received in revised form April 10, 2008

Abstract – To search the antiseptic agents capable to decontaminate the plants from pathogens the combined effect of moderate heat shock (45°C) and glycolysis inhibitor monoiodoacetate (MIA) on survival of potato pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) and yeast *Saccharomyces cerevisiae* was studied. Under optimal temperature cultivation (26°C) MIA had no toxic effect on *S. cerevisiae* but decreased viability of Cms. The lethal effect of MIA significantly increased during heat treatment at 45°C. MIA in the range from 0.1 to 1 mM decreased the thermotolerance of Cms and *S. cerevisiae* cells in 10-10000 folds in dependence from time of treatment. A minimal concentration of MIA capable to affect the thermotolerance was 0.1 and 0.3 mM for *S. cerevisiae* and Cms, respectively. The effect of MIA on Cms and yeast survival during heat shock was stronger in logarithmic phase than in stationary ones.

*Key words: monoiodoacetate / thermotolerant / Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus /
Saccharomyces cerevisiae*

ORIGINAL ARTICLE

**ВЛИЯНИЕ МОНОЙОДАЦЕТАТА НА ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТЬ
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SSP. *SEPEDONICUS* И ДРОЖЖЕЙ
*SACHAROMYCES CEREVISIAE***

Рымарева¹ Е. В., Рихванов Е. Г., Торгашина М. А.
Перфильева А. И., Копытчук В. Н., Варакина Н. Н.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. 664033, Иркутск, а/я 317, ул. Лермонтова, 132 Россия

¹e-mail: elenar@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 30 марта 2008 г.

После ревизии 10 апреля 2008 г.

В ходе поиска асептических агентов изучали комбинированное действие теплового шока (45°C) и монойодацетата (МИА) на выживаемость *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) и дрожжей *Sacharomyces cerevisiae*. При оптимальной температуре (26°C) в логарифмической фазе роста МИА оказывал летальное действие только на *Cms*, не ограничивая жизнеспособность *S. cerevisiae*. Показано, что ингибирующее влияние МИА на бактерии и дрожжи возрастает при тепловом шоке (45°C). В концентрациях 0,3 и 1,0 мМ МИА снижал выживаемость *Cms* в логарифмической и стационарной фазах роста при температуре 45°C на 10-100% в зависимости от времени термообработки. Наибольшее ингибирующее влияние МИА на выживаемость бактерий при 45°C отмечалось в логарифмической фазе роста. При росте *S. cerevisiae* на среде с глюкозой ингибитор усиливал гибель дрожжей при тепловом шоке (45°C). В случае использования среды с этанолом МИА усиливал летальный эффект высокой температуры. Минимальная ингибирующая концентрация МИА при 45°C, подавляющая растущие клетки дрожжей составила 0,1 мМ, для *Cms* - 0,3 мМ.

Key words: монойодацетат / термотолерантность / *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* / *Sacharomyces cerevisiae*

В последнее десятилетие одной из самых серьезных причин снижения эффективности картофелеводства стало массовое развитие болезней, вредителей и сорняков во время

вегетации, различных гнилей при хранении. Потери урожая могут составлять от 10 до 50% и более в неблагоприятные годы. Причем до 20% урожая картофеля может пострадать от кольцевой

гнили клубней картофеля, которую вызывает грамположительная бактерия - *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) (Иванюк и др., 2005). Возбудитель болезни может сохраняться как на поверхности, так и внутри клубней, чаще в столлоной части. При сборе урожая зараженные клубни внешне ничем не отличаются от здоровых. Развитие скрытой формы кольцевой гнили зависит в значительной степени от погодных условий в год выращивания картофеля. Так, например, после засушливого периода вегетации и высоких летних температур наблюдается незначительный wilt (увядание) растений, однако можно прогнозировать увеличение числа клубней со скрытой формой инфекции.

В настоящее время возрастает актуальность разработки и внедрения, современных безопасных технологий выращивания и хранения картофеля. Уже существует множество методов и способов защиты растений от различного рода фитопатогенов. Широко распространенным в массовом производстве картофеля является химический метод. Но современные пестициды не всегда удовлетворяют нормам безопасности для человека и окружающей среды. Известно, что пестициды занимают первое место в списке наиболее значимых антропогенных факторов загрязнения. Метаболическая активность многих химических средств защиты в растительных тканях приводит к образованию мутагенных соединений, обладающих генетической опасностью (Дмитриев и др., 2005). В тоже время, в литературе встречаются данные о том, что ферментативные системы растений картофеля подвергают пестициды биотрансформации после которой, в клубнях картофеля не выявляются метаболиты, обладающие мутагенной активностью (Кривошеева и др., 2003). Список пестицидов с фунгицидными и бактерицидными свойствами постоянно пополняется, причем часто не отслеживаются механизмы трансформации и

утилизации химических соединений в растениях и клубнях картофеля. Данная работа посвящена исследованию малоизученного в отношении растений и микроорганизмов ингибитора - монойодацетата (МИА) и является начальным этапом в поиске новых асептических агентов для последующего применения в области защиты растений. Параллельно были проведены исследования по сравнению действия монойодацетата на базовую и индуцированную термотолерантность дрожжей *Sacharomyces cerevisiae*. Дрожжи, в качестве объекта исследования были выбраны, потому что физиологические особенности этих микроорганизмов позволяют достаточно быстро получать результаты при использовании недорогих питательных сред и простых методов исследования.

Некоторые авторы рекомендуют применять термообработку или осенний обогрев клубней картофеля перед закладкой их на зимнее хранение. Установлено, что обогрев клубней при +18 - +20°C и относительной влажности воздуха 90-95% в течение 10-20 дней способствует повышению их устойчивости к мокрым гнилям и обеспечивает лучшую сохранность клубней при хранении (Иванюк и др., 2005). С другой стороны длительный и умеренный прогрев клубней ускоряет проявление симптомов скрытой (латентной) инфекции, которая, как известно, характерна для заболевания кольцевой гнили картофеля. Учитывая тот факт, что ранее термотолерантность возбудителя кольцевой гнили картофеля не исследовалась, целью нашей работы было изучение влияния МИА на термотолерантность патогена. Эксперименты были направлены на изучение влияния монойодацетата на фитопатоген в различных фазах роста при нормальной температуре роста (26°C), а так же в условиях умеренного теплового шока при 45°C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали бактерии *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Spieck. Et Kotth) Skaptason et Burk, штамм 5369 (вирулентный, мукоидный), полученные из НИИКХ (пос. Коренево, Московской обл.). Культуру выращивали в колбах на среде, содержащей: дрожжевой экстракт - 10 г/л, глюкоза - 15 г/л, CaCO_3 - 5г/л, pH 7. Для твердой среды добавляли агар-агар – 15 г/л. Бактерии *Cms* выращивали 5 суток на твердой среде затем одиночные колонии переносили в 20 мл жидкой среды и инкубировали в колбах на качалке в течение 1-13 суток при 26°C, в темноте. Для определения динамики роста бактерий оптическую плотность культуры регистрировали посуточно на планшетном спектрофотометре при 655 нм (Bio-Rad, США).

Определение восстанавливающей активности *Cms* проводили с использованием 2,3,5 – трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) по методу (Еникеев А.Г., 1985). Для изучения влияния МИА на выживаемость бактерий в клеточную суспензию *Cms* (2×10^8 кл/мл) – логфаза и *Cms* (9×10^8 кл/мл) – стационарная фаза вносили ингибитор в конечных концентрациях: 0.1, 0.3 и 1.0 мМ. Затем пробирки инкубировали 15, 30, 45 и 60 мин при 26°C. После чего производили 5 десятикратных разведений в специальных железных чашках и с помощью репликатора высаживали в чашки Петри. Инкубацию бактерий на твердой среде проводили при 26°C. Количество образовавшихся колоний учитывали после 10 суток роста. Выживаемость бактерий определяли как процент образовавшихся колоний после определенного периода комбинированного теплового и химического воздействия к количеству колоний до стресса.

Для изучения комбинированного действия моноиодацетата и теплового шока на выживаемость бактерий в клеточную суспензию

Cms (2×10^8 кл/мл) – логфаза и *Cms* (9×10^8 кл/мл) – стационарная фаза, вносили ингибитор в концентрациях 0.1, 0.3 и 1.0 мМ и немедленно после этого клетки подвергали действию теплового шока при 45°C. Пробирки с суспензией бактерий экспонировали в условиях гипертермии 15, 30, 45 и 60 мин. После окончания теплового воздействия суспензию клеток охлаждали, разводили и высевали методом описанным выше.

Также в работе использовали штамм родительского типа *S. cerevisiae* Ψ -74-D694 (*MATa*, *ade1-14(UGA)*, *trp1-289(UAG)*, *his3-200*, *ura3-52*, *leu2-3*, *112 \psi*~J). Дрожжи выращивали на среде YEPD (дрожжевой экстракт - 5 г/л, пептон - 10 г/л, глюкоза - 20 г/л). В зависимости от задач эксперимента, глюкоза в среде заменялась эквивалентным количеством галактозы (20 г/л) - YEPGal или этиловым спиртом (20 мл/л) – YEPE. Для приготовления твердых сред добавляли в указанные выше среды агар-агар (15 г/л). В ходе экспериментов дрожжи поддерживали на среде YEPD при 30°C.

Исследуемый штамм дрожжей высевали на твердую среду YEPD, выращивали в течение двух суток при температуре 30°C. Затем пересекали в жидкую среду YEPD (YEPGal, YEPE), в зависимости от проводимого эксперимента. Небольшое количество штамма (1-2 единичных колонии) переносили в конические колбы объемом 250 мл, содержащие 25 мл соответствующей среды. Далее инкубировали в течение ночи в термостатируемой качалке при 30°C.

Выживаемость дрожжей при действии теплового шока и ингибитора (моноиодацетата) изучали, экспонируя пробирки, в которые добавляли по 1 мл культуры (в логарифмической или с стационарной фазе роста) и по 50 мкл ингибитора разной концентрации 0,1 мМ, 0,3 мМ, 1,0 мМ и инкубировали при температуре 45°C в термостатической качалке в течение 15, 30, 45 и

60 мин для логарифмической культуры, и 30, 60, 90, 120 мин - для стационарной.

По истечению времени, содержимое пробирок охлаждали и переносили в металлическую чашку с лунками и производили ряд десятикратных разведений. Затем с помощью репликатора делали посев на твердую среду YEPD и выращивали колонии в течение двух суток при температуре 30° С. Выживаемость дрожжей определяли как процент образовавшихся колоний после определенного периода теплового воздействия к количеству колоний до теплового шока.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что бактерии *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* – облигатные аэробы; нуждаются в богатых питательных средах, растут медленно. Это хемоорганотрофные бактерии с метаболизмом дыхательного типа с образованием небольшого количества кислоты из глюкозы и некоторых других углеводов. Оптимальная температура для роста 20 - 29°С; в редких случаях растут при температуре выше 35°С (Хаунт и др., 1997). Надо заметить, что *Cms* очень капризный объект при выращивании *in vitro* и нестабилен по составу и количеству секретируемых экзометаболитов (Westra, Slack, 1992; Рымарева, 2001). В ходе настоящих исследований были уточнены фазы роста *Cms*. Так, логарифмическая фаза составляла 6 суток, затем бактериальная культура переходила в стационарную фазу (рис. 1). При этом пик интенсивности восстановления ТТХ отмечался на 2 сутки роста культуры, на 9 сутки роста восстанавливающая активность бактерий падала практически до нуля (рис. 2). Можно предположить, что бактерии именно в течение первых двух суток роста имеют максимальную дыхательную активность и наиболее восприимчивы к ингибирующему действию МИА.

Известно, что МИА при концентрации 10^{-3} М специфически ингибирует ферменты: триозофосфатдегидрогеназу (Досон и др., 1991), дрожжевую алкогольдегидрогеназу и глицеральдегидфосфатдегидрогеназу (Диксон, Уэбб, 1982). Именно на начальном этапе второй стадии гликолиза и этапе образования АТФ и происходит ингибирование МИА (Мызина, Кнорре, 1998). Таким образом, МИА выступает ингибитором для процессов гликолиза, брожения и дыхания. Этот ингибитор имеет скрытый период действия, который обратно пропорционален концентрации ингибитора. Причем этот период более короткий для гликолиза, чем для дыхательных процессов. Поэтому депрессия дыхания второстепенна и следует за ингибированием гликолиза. Еще одним интересным моментом является слабая персистентность МИА. При повышении температуры, через 2-3 часа при температуре 40 градусов происходит его разложение на уксусную кислоту и йод (Webb, 1963).

Опыты по изучению влияния МИА на выживаемость бактерий при температуре 26°С показали, что ингибитор в концентрациях 0,3 мМ и 1,0 мМ имел определенный токсический эффект на выживаемость *Cms* в логарифмической фазе роста при совместной инкубации в течение часа. Причем, концентрация МИА 1,0 мМ оказалась максимально эффективной для гибели быстрорастущих клеток возбудителя болезни при культивировании в нормальных условиях (рис. 3). В среднем колониеобразующая способность бактериальных клеток снижалась в 2,7 раза т.е. на 60%. В стационарной фазе роста МИА не имел самостоятельного летального эффекта на *Cms* независимо от концентрации и времени воздействия, что позволяет предполагать определенную роль ингибитора в угнетении дыхания быстрорастущих клеток бактерий. С другой стороны, с увеличением исходного титра бактерий возрастала их устойчивость к

воздействию ингибитора, возможно, здесь присутствует «чувство кворума», которое способно координировать экспрессию генов стрессоустойчивости (Cao and al., 2001).

Для выяснения основного лимитирующего фактора на выживаемость, бактерии подвергали совместному действию теплового шока (45°C) и ингибитора в нарастающих концентрациях. Как показали результаты, культура *Cms* в логарифмической и стационарной фазах роста сохраняла жизнеспособность после часовой тепловой обработки при 45°C (рис. 4). В тоже время, бактерии в фазе стационарного роста оказались более термотолерантными, чем в логарифмической фазе (рис. 4, б). В лог-фазе при действии МИА в концентрациях 0,3 и 1,0 mM в

течении 45 и 60 мин при 45°C бактерии полностью погибали (рис. 4, а). Ингибитор в минимальной концентрации 0,1 mM эффективно снижал выживаемость бактерий в логарифмической стадии роста только после 45 мин теплового воздействия. В тоже время, летальное действие 0,3 и 1 mM МИА было заметно уже после 30 мин теплового шока и после 45 мин оно становилось максимальным (рис. 4, а). В стационарной фазе клетки *Cms* оказались более устойчивыми к комбинированному действию теплового шока и МИА. Так, ингибитор в концентрациях 0,3 и 1,0 mM заметно снижал жизнеспособность клеток *Cms* только по истечению 45 мин совместной инкубации, в то время как в лог-фазе подобное действие отмечалось уже после 30 мин.

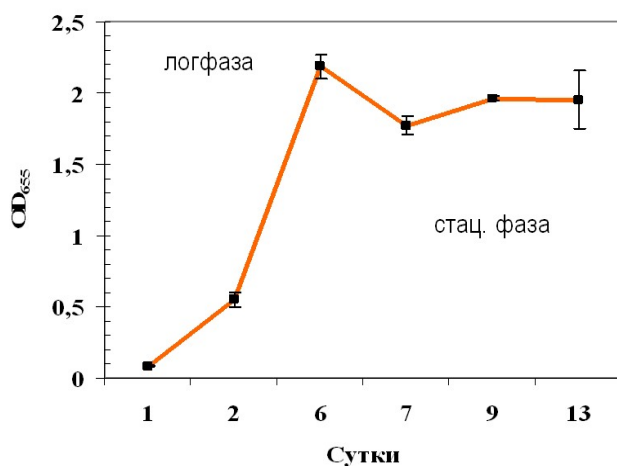


Рис. 1. Динамика роста *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* на среде с дрожжевым экстрактом при температуре 26°C.

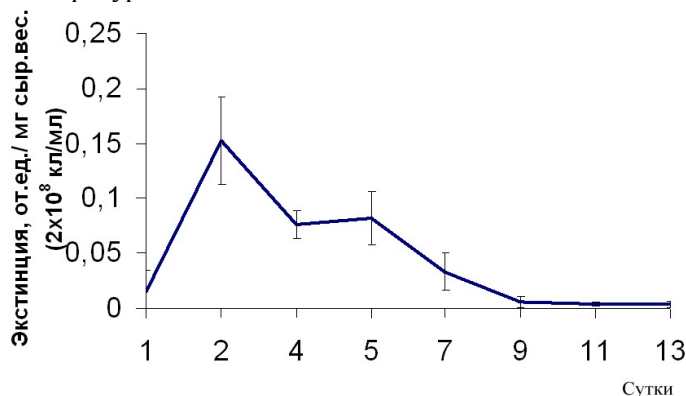


Рис.2. Интенсивность восстановления ТТХ (2,3,5 – трифенилтетразолий хлорид) клетками *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (штамм 5369) в жидкой среде.

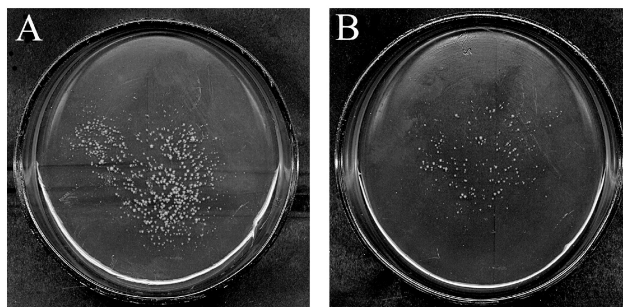


Рис. 3. Влияние моноиодацетата на выживаемость *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в логарифмической фазе роста при температуре 26°C. Инкубация 60 мин. Титр $1,3 \times 10^9$ кл/мл. А – контроль, В – с 1 мМ моноиодацетатом.

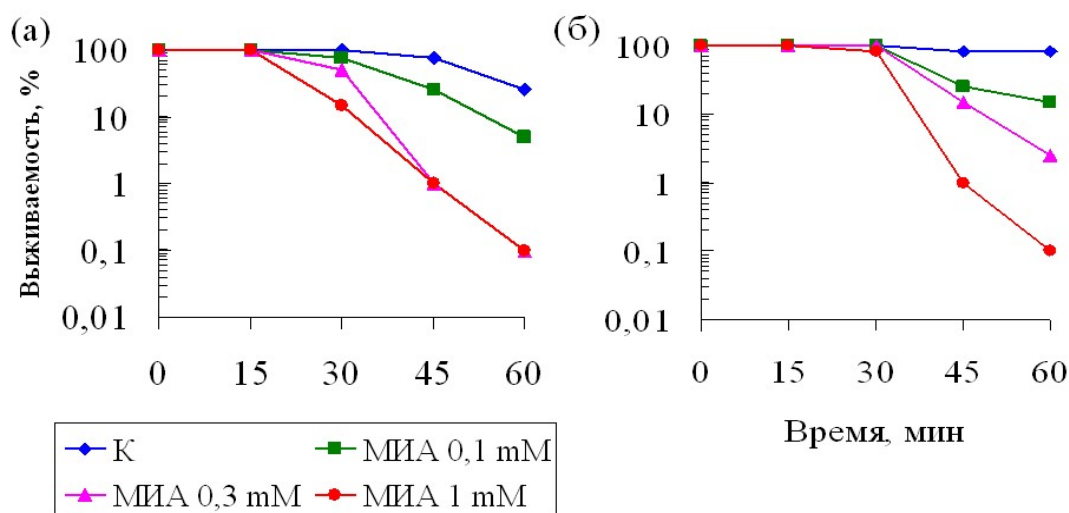


Рис. 4. Влияние моноиодацетата на выживаемость *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в логарифмической (а) и стационарной (б) фазах роста при температуре 45°C.

Таким образом, в стационарной фазе развития термотолерантность бактерий менее зависела от концентрации ингибитора. По-видимому, этот результат можно объяснить замедленным метаболизмом культуры в стационарной фазе. Возможно, эффект действия ингибитора уменьшается пропорционально количеству живых клеток в стареющей культуре *in vitro*. С другой стороны, положительное влияние на выживаемость бактерий могла оказывать их плотность, так

называемый «чувствующий кворум» бактерий (Cao and al., 2001). Кроме того, стационарная культура может быть термоустойчивее за счет накопления антиоксидантных ферментов во взрослой культуре. Таким образом, с одной стороны было доказано, что ингибирующее влияние моноиодацетата возрастало при повышенной температуре, что значительно усиливало гибель бактерий, с другой, данный ингибитор более эффективно действовал в лог-фазе роста бактерий.

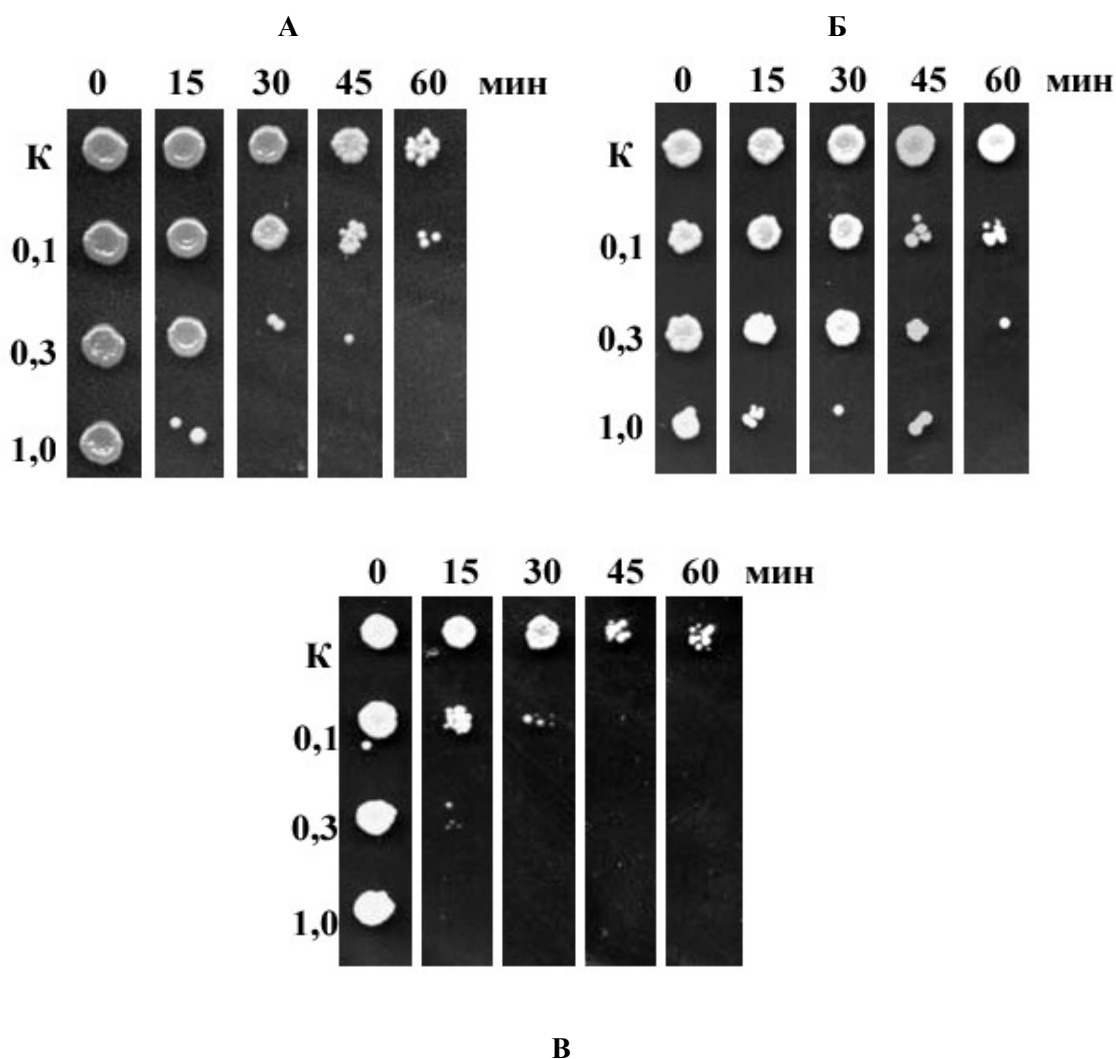


Рис. 5. Влияние моноиодацетата на выживаемость *S. cerevisiae* в логарифмической стадии роста, на среде YEPD (А), YEPGal (Б), YEPE (В) при температуре 45°C.

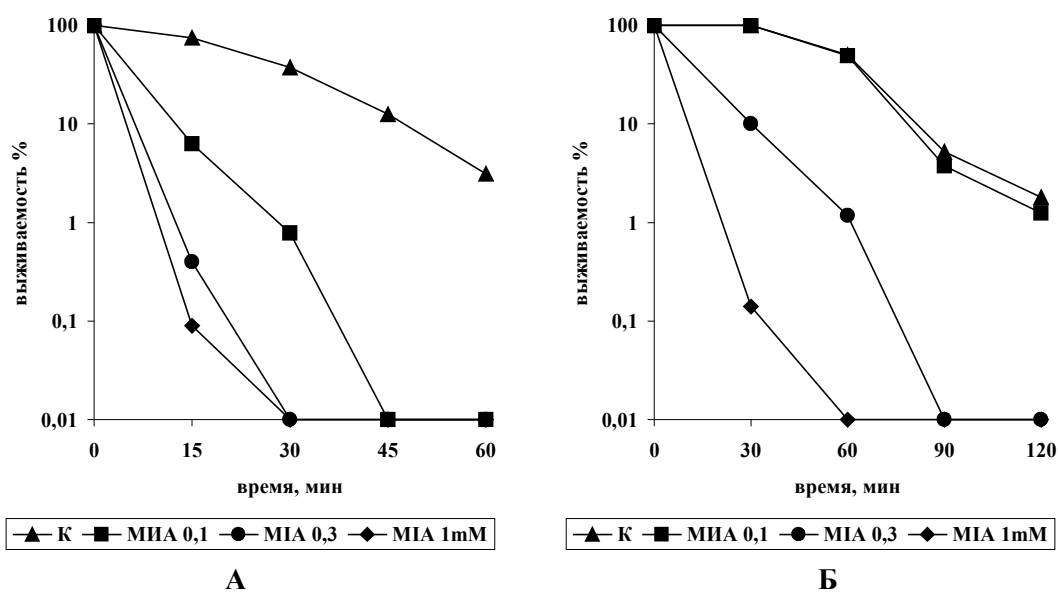


Рис. 6. Влияние моноиодацетата на выживаемость *S. cerevisiae* на среде YEPE на логарифмической (А) и стационарной (Б) стадиях роста при температуре 45°C.

Способность дрожжевой клетки переживать действие температуры выше максимальной обуславливает ее базовую термотолерантность. Предварительная обработка клеток *S. cerevisiae* при температуре выше оптимальной индуцирует устойчивость дрожжей к последующему летальному тепловому шоку. Это явление получило название индуцированная термотолерантность или тепловая закалка (Александров, Кислюк, 1994). Изучаемый нами вид дрожжей давал хороший рост после 48 часов инкубации на среде YEPD при 30°C.

Инкубация в присутствии ингибитора при температуре 30°C в течение часа показала, что монойодацетат при этих условиях не имел собственного токсичного эффекта на *S. cerevisiae* в логарифмической фазе роста.

Далее мы изучили толерантность исследуемого нами вида дрожжей к кратковременному летальному воздействию теплового шока совместно с действием ингибитора, выращивая их на различных средах. Известно, что термотолерантность дрожжей *S. cerevisiae* изменяется в зависимости от источника углерода в среде культивирования. Наши исследования показали, что действие ингибитора на термотолерантность *S. cerevisiae* также зависело от источника углерода в среде культивирования. При росте *S. cerevisiae* на среде с глюкозой ингибитор усиливал гибель дрожжей при тепловом шоке 45°C (рис. 5, А). Аналогичный результат действия монойодацетата на выживаемость дрожжей при тепловом шоке мы наблюдали, когда в среде культивирования глюкоза заменялась галактозой (рис. 5, Б). Дрожжи, растущие на глюкозе, оказались менее устойчивы к тепловому шоку, чем выращенные на галактозе. А в случае использования среды с этанолом монойодацетат еще более усиливал летальный эффект высокой температуры (рис. 5, В). Есть предположение, что это может быть связано с особенностью МИА, который

специфически ингибирует алкогольдегидрогеназу дрожжей.

Проведенные исследования доказали, что ингибирующее влияние монойодацетата на дрожжи возрастало при повышенной температуре. Из полученных результатов видно, что МИА даже в самой слабой концентрации - 0,1 mM эффективно снижал выживаемость дрожжей в логарифмической стадии роста на среде YEPD при действии теплового шока (рис. 6, А), в тоже время на стационарную культуру он не имел ингибирующего влияния (рис. 6, Б) после часовой совместной инкубации. С одной стороны было доказано, что данный ингибитор действительно усиливал действие теплового шока. С другой стороны, токсичность монойодацетата возрастала при повышенной температуре, что значительно усиливало гибель микроорганизмов. Таким образом, нами была определена концентрация монойодацетата не влияющая на стационарные культуры, но подавляющая растущие организмы. Концентрация данного ингибитора равная 0,1 mM удовлетворяет всем требованиям, чтобы быть использованной в фитоиммунологических целях. Для бактерий *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* самой эффективной концентрацией ингибитора оказалась 1 mM при термообработке в течение 1 часа для любой стадии роста. Таким образом, при тепловом шоке (45°C) дрожжи на логарифмической стадии роста оказались более чувствительными к МИА, чем бактерии, что может объясняться различием в их метаболизме

ЛИТЕРАТУРА

- Александров В.Я., Кислюк И.М. (1994) Реакция клетки на тепловой шок: Физиологический аспект. *Цитология*, 36, 1, 5-59.
- Диксон М., Уэбб Э. (1982) *Ферменты*. Москва, Мир, 1, 392 с.

- Дмитриев А.П., Полищук В.П., Гродзинский Д.М. (2005) Индуцирование системной устойчивости у растений биогенными индукторами. *Вестник харьковского аграрного университета*, 1(6), 19-27.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. (1991) *Справочник биохимии*. Москва, Мир,
- Еникеев А.Г., Высоцкая Е.Ф., Леонова Л.А., Гамбург К.З. (1995) Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток. *Физиология растений*, 42, 3, 423-426.
- Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. (2005) *Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков*. Минск: Бенлпринт, 696 с.
- Кривошеева А.П., Карамова Н.С., Колпаков А.И. (2003) Трансформация пестицидов в картофеле. *Сборник тезисов 7-ой Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века, 14-18 апрел, с. 181.*
- Мызина С.Д., Кнорре Д.Г. (1998) *Биологическая химия*. Москва, Высш. шк. 479 с.
- Определитель бактерий Берджи* под ред. Дж. Хаунта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уильямса. (1997) Москва, Мир, 2, с. 584.
- Рымарева Е.В. (2001) Роль клеточных стенок растения-хозяина и экзополисахаридов возбудителя кольцевой гнили картофеля на детерминантной стадии патогенеза: *Автореф. дис. Канд. биол. наук*: 25.04.2001. Иркутск: СИФИБР СО РАН, 24 с.
- Cao H., Baldini R.L., Rahme L.G. (2001) Common Mechanisms for Pathogens of Plants and Animals. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**, 259-284.
- Webb J.L. (1963) *Enzyme and metabolic Inhibitors*, New York, **1**. 487-512.
- Westra A.A.G., Slack S.A. (1992) Isolation and characterization of extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology*, **82**, 1193-1199.