

В. І. Ємельянов, С. О. Поляковський,
член-кореспондент НАН України О. П. Дмитрієв

Тригерний діапазон концентрацій цитозольного кальцію в індукції захисних реакцій у клітинах томатів (*Lycopersicon esculentum* L.)

Changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in elicitor-treated cells were determined, and the calcium-dependent increase of chitinase activity and callose accumulation were analyzed. At first, the trigger range of calcium concentration changes was shown. This range limits the callose accumulation, but does not block an increase of chitinase activity in tomato cells.

При контакті рослинних клітин з патогенними мікроорганізмами на первинних етапах взаємодії відбувається швидке розпізнавання один одного, що і зумовлює їх подальші стосунки [1]. У міжклітинному просторі постійно підтримується певний (конститутивний) рівень активності низки гідролітичних ферментів [2], які здатні утворювати сигнальні молекули — біотичні еліситори зі специфічних мікроорганізмів [1]. Еліситори, у свою чергу, зв'язуються з певними рецепторними ділянками плазматичної мембрани рослинних клітин [3], чим забезпечується зміна заряду в області їх взаємодії і відбувається передача сигналу всередину клітини. Сигнальний імпульс опосередковано передається, як правило, на G-білки. Останні змінюють свій конформаційний стан, спричиняють фосфорилювання та дефосфорилювання білків, активують стартові ферменти сигнальних систем [3].

Однією з найбільш ранніх відповідей рослинних клітин на інфікування чи обробку біотичними еліситорами є зростання концентрації іонів Ca^{2+} в цитозолі ($[Ca^{2+}]_{цит}$). Так, через 2 хв після додавання олігомерів хітину до клітин томатів [4] відбувається потенціалзалежне зростання $[Ca^{2+}]_{цит}$. Через 5 хв після обробки клітин цибулі біотичними еліситорами [5] рівень $[Ca^{2+}]_{цит}$ підвищується більш ніж у 1,5 раза. Таким чином, кальцієва сигнальна система працює вже з перших хвилин взаємодії рослинних клітин з патогенами чи їх метаболітами.

Деполаризація плазматичної мембрани, імовірно за все, відбувається за рахунок певного заповнення рецепторних ділянок еліситорами, що змінює сумарний заряд плазмалемми та призводить до накопичення критичного для клітини співвідношення різниці потенціалів на її зовнішній та внутрішній поверхнях. Останнє забезпечує адекватну відповідь клітин на зміни "оточуючого середовища". У клітинах відбувається активація окремих G-білків, зростає активність протеїнкіназ, вмикаються стартові ферменти окремих сигнальних систем. У клітинах опосередковано інозитолтрифосфатам та цАМФ активуються кальцієві канали плазмалемми. Останнє призводить до зростання рівня $[Ca^{2+}]_{цит}$, активації Ca^{2+} -залежних та Ca^{2+} -кальмодулінзалежних протеїнкіназ, які безпосередньо здатні ініціювати фактори регуляції транскрипції відповідних захисних генів [3]. Таким чином, опосередковане зростання $[Ca^{2+}]_{цит}$ спричиняє швидкі зміни процесів біосинтезу у рослинних клітинах, чим і досягається адекватний захист системи від експансії паразитарного мікроорганізму.

Інгібіторний аналіз кальцієвої сигнальної системи вказує на необхідність участі іонів Ca^{2+} у формуванні індукованого відкладання калози [6, 7] та зростання хітиназної активності [7] у клітинах цибулі та томатів. При обробці клітин суспензії томатів однаковими

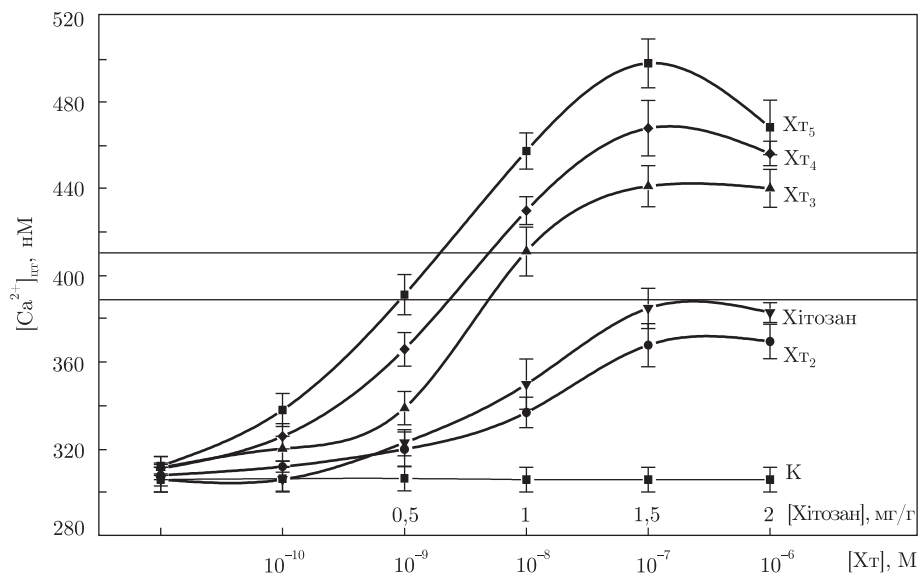


Рис. 1. Індуковані зміни концентрації цитозольного кальцію в клітинах томатів і його тригерний діапазон

концентраціями олігомерів хітину в культуральному середовищі поряд зі зростанням хітиназної активності [8] відбувалось поступове зменшення кількості відкладеної калози [9]. Отже, механізм регуляції цих захисних реакцій у клітинах томатів залишається незрозумілим та потребує детального вивчення.

Аналіз існуючих даних дав змогу припустити, що, можливо, певні зміни $[Ca^{2+}]_{інт}$ можуть активувати певну кількість специфічних Ca^{2+} -залежних та Ca^{2+} -кальмодулінзалежних протеїніназ, які, у свою чергу, ініціюватимуть певні фактори регуляції транскрипції. Останнє може призвести до експресії генів адекватних кальцієвому сплеску захисних реакцій.

Для перевірки даного припущення нами було запропоновано методику [4] прямого виміру змін $[Ca^{2+}]_{інт}$, індукованих активними концентраціями біотичних еліситорів [8, 9], в клітинах *Lycopersicon esculentum*.

Матеріали та методи. Індукцію $[Ca^{2+}]_{інт}$ стимулювали додаванням до клітин томатів наномолярних (10^{-10} – 10^{-6}) концентрацій олігомерів хітину (N-ацетилглюкозамін) з різною довжиною ланцюга — від 2 до 5 ацетилглюкозамінних залишків (X_{т2}, X_{т3}, X_{т4}, X_{т5}).

Рівень $[Ca^{2+}]_{інт}$ фіксували за допомогою спектрофлуориметра СДЛ-2 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Росія), методом флуоресцентних зондів [4]. Зонд INDO-1 завантажували в протопласти томатів за модифікованим методом кислих рН [5], попередньо отриманих за методикою [4].

Зміни $[Ca^{2+}]_{інт}$ порівнювали з отриманими нами раніше результатами вивчення індукованих захисних реакцій [8, 9].

Результати та їх обговорення. Додавання олігомерів хітину до суспензії протопластів томатів викликало зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Усі без винятку олігомери в концентраціях 10^{-10} – 10^{-6} М спричиняли зміни $[Ca^{2+}]_{інт}$ у протопластах томатів. Величина $[Ca^{2+}]_{інт}$ залежала від концентрації та довжини ланцюга елісатора (рис. 1).

Мінімальну індукуючу активність виявив X_{т2}-еліситор. При обробці протопластів цим еліситором у концентрації 10^{-10} М рівень $[Ca^{2+}]_{інт}$ майже не відрізнявся від рівня контролю

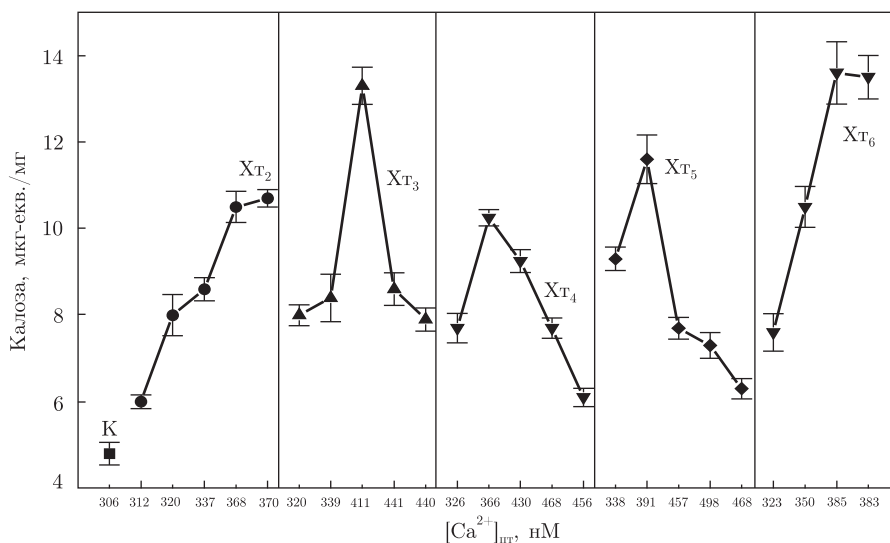


Рис. 2. Залежність накопичення кількості калози від концентрації цитозольного кальцію

(див. рис. 1). При додаванні Xт₂-елісатора в концентраціях 10⁻⁷ та 10⁻⁶ М рівень [Ca²⁺]_{цт} становив відповідно 368 та 369 нМ. У свою чергу, елісатори з більшою довжиною ланцюга (Xт₃, Xт₄, Xт₅) індукували зміни рівня [Ca²⁺]_{цт} у більш високому діапазоні концентрацій (див. рис. 1). Найістотніші зміни [Ca²⁺]_{цт} викликав Xт₅-елісатор. При концентрації цього елісатора 10⁻⁹ М рівень [Ca²⁺]_{цт} становив 391 нМ, а при концентрації 10⁻⁸ М — підвищувався до 457 нМ. У контролі рівень [Ca²⁺]_{цт} становив 306 нМ. Максимальний рівень [Ca²⁺]_{цт} — 498 нМ, зареєстрований після обробки протопластів томату Xт₅-елісатором у концентрації 10⁻⁷ М.

Отримані результати дозволили проаналізувати залежність індукованих захисних реакцій [8, 9] від змін рівня [Ca²⁺]_{цт}. Підвищення [Ca²⁺]_{цт} у цитозолі до певного рівня супроводжувалось поступовим зростанням хітиназної активності та збільшенням кількості відкладеної в клітинах калози. При досягненні певного рівня [Ca²⁺]_{цт} синтез калози у томатів припинявся. Так, у зразках, оброблених Xт₃-, Xт₄- та Xт₅-елісаторами, зростання [Ca²⁺]_{цт} вище рівня 366–411 нМ супроводжувалось зменшенням накопичення калози клітинами (рис. 2). Подальша стимуляція підвищення рівня [Ca²⁺]_{цт} елісаторами призводила до поступового зменшення кількості її накопичення, проте хітиназна активність клітин продовжувала зростати (рис. 3).

Отримані дані свідчать про наявність у клітинах томатів діапазону [Ca²⁺]_{цт}, що лімітує реакцію відкладання калози.

Обробка томатів хітозаном [4] та Xт₂-елісатором стимулювала дещо нижчі за рівнем зміни [Ca²⁺]_{цт} — від 368 до 386 нМ. При подальшому підвищенні концентрації цих елісаторів у культуральному середовищі зростання [Ca²⁺]_{цт} та обох захисних реакцій не відбувалось. Таким чином, додавання максимально активних концентрацій хітозану та Xт₂-елісатора не перевищувало порогового — тригерного діапазону [Ca²⁺]_{цт} в клітинах томатів. При додаванні Xт₄-елісатора в концентрації 10⁻⁹ М відкладання калози в клітинах припинялось, а рівень [Ca²⁺]_{цт} при цьому становив 366 нМ. Подальше підвищення концентрації цього елісатора до 10⁻⁸ М сприяло зростанню рівня [Ca²⁺]_{цт} до 430 нМ, а кількість накопиченої калози при цьому починала зменшуватись. Таким чином, зменшення відкладання калози

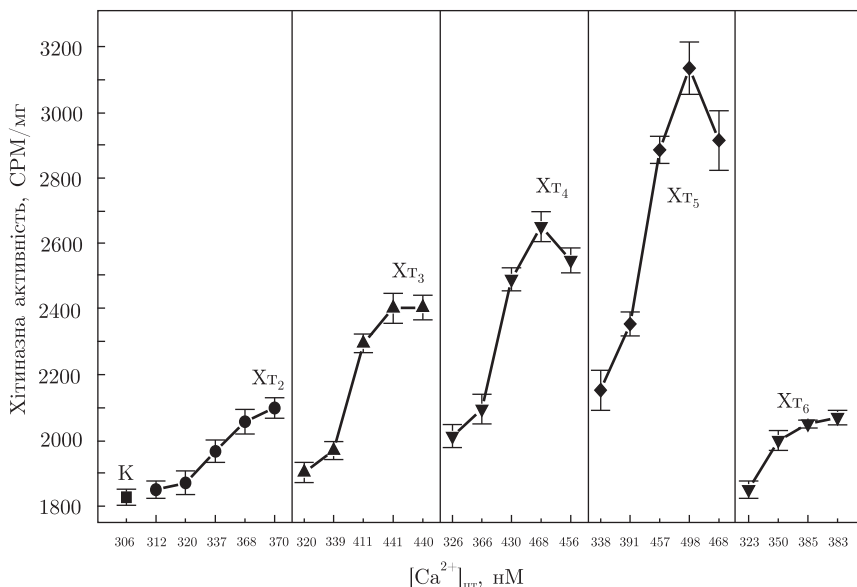


Рис. 3. Залежність величини індукованої хітиназної активності від концентрації цитозольного кальцію

при обробці клітин X_{т₄}-еліситором відбувається в межах концентрацій 10^{-9} – 10^{-8} М. Відповідно, і тригерний діапазон $[Ca^{2+}]_{cyt}$ знаходиться в межах від 366 до 430 нМ. Враховуючи результати, які було отримано при обробці клітин хітозаном та X_{т₂}-еліситором, цей концентраційний діапазон повинен бути не меншим за 386 нМ.

Аналіз змін $[Ca^{2+}]_{cyt}$, таким чином, дозволив визначити його тригерний діапазон (див. рис. 1). Він знаходиться в межах від 386 до 411 нМ. При індукованому зростанні $[Ca^{2+}]_{cyt}$ вище 411 нМ кількість калози, відкладеної в клітинах, поступово зменшується. Результати дослідження свідчать про наявність у клітинах томатів механізму, що вмикає ті чи інші захисні реакції за допомогою певних діапазонів $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

Підводячи підсумки проведеної роботи, варто підкреслити, що в природі існують еліситори, які здатні викликати певні метаболічні зміни в клітинах, але їх хімічна будова зумовлює індукування лише деяких захисних реакцій. Крім того, вони не здатні вмикати інші, більш ефективні захисні реакції клітин, наприклад зростання хітиназної активності до максимально можливого рівня. До них належать хітозан [4] та X_{т₂}-еліситер. Індуктори захисних реакцій з більш високою еліситорною активністю, такі як X_{т₃}-, X_{т₄}- та X_{т₅}-олігомери, зумовлюють накопичення в рослинних клітинах іншого співвідношення захисних речовин [8, 9]. Отримані результати свідчать про те, що регуляція захисних реакцій за типом каскаду [1] в клітинах томатів відбувається за рахунок певних змін $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

У клітинах томатів, а можливо, і в клітинах інших видів рослин, існують тригерні діапазони $[Ca^{2+}]_{cyt}$, які змінюють баланс захисних речовин та забезпечують найбільш ефективний захист рослинної клітини від патогену. Тобто при наявності певного рівня зовнішніх сигналів, “зрозуміло” для клітин хімічної будови, за рахунок короткочасного підвищення $[Ca^{2+}]_{cyt}$ відбувається опосередковане вмикання певного механізму фітоімунної відповіді, яке забезпечує адекватний захист системи клітин від паразитарного мікроорганізму.

Таким чином, згідно з результатами дослідження, для успішного захисту клітин томатів від патогенів у перші хвилини після еліситації вкрай необхідні зміни $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Наявність іонів кальцію в цитозолі зумовлює подальший каскад реакцій, які забезпечують ефектив-

ний захист рослинних клітин від патогенів. Залежно від первинного елісаторного імпульсу відбуваються певні зміни $[Ca^{2+}]_{цит}$, що, у свою чергу, впливає на фосфорилювання і дефосфорилювання білків [10], експресію генів [11] та на подальшу імунну відповідь клітин [12]. Отримані результати дозволили виявити тригерний діапазон $[Ca^{2+}]_{цит}$, який лімітує кількість накопичення калози в клітинах томатів. При зростанні $[Ca^{2+}]_{цит}$ вище 386–411 нМ клітини перерозподіляють вивільнені з реакції відкладання калози енергетичні ресурси на інші біохімічні реакції, які, таким чином, можуть забезпечити їй більш ефективний захист від експансії патогенного мікроорганізму. Клітини починають підвищувати рівень активності гідролітичних ферментів [9], синтезувати та накопичувати фітоалексини [13], велику кількість фенольних сполук [14] тощо. Накопичення критичної маси таких речовин, у свою чергу, призводить до реакції надчутливості — виникнення некротичних тканин в області проникнення патогену, де разом з клітинами хазяїна відбувається загибель мікроорганізму. Але, чи здатні клітини томатів викликати вищезазначені реакції при перевищенні в них тригерного діапазону $[Ca^{2+}]_{цит}$, невідомо і є завданням наших подальших наукових пошуків. Проведене дослідження дозволило створити підґрунтя для подальшого вивчення біохімічних захисних реакцій, індукованих у рослинних клітинах, та ролі кальцієвої сигнальної системи в їх диференціації.

1. *Дмитриев А. П.* Фитоалексини и их роль в устойчивости растений. – Киев: Наук. думка, 1999. – 209 с.
2. *Ємельянов В. І., Дмитрієв О. П., Гродзінський Д. М.* Індукція хітиназної активності хітиновими фрагментами різної довжини в суспензійній культурі клітин томату (*Lycopersicon esculentum*) // Доп. НАН України. – 1999. – № 11. – С. 156–158.
3. *Тарчевский И. А.* Сигнальные системы клеток растений. – Москва: Наука, 2002. – 294 с.
4. *Ємельянов В. І., Ноздренко Д. М.* Зміни цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} у клітинах томатів // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Пробл. регуляції фізіол. функцій. – 2006. – **11**. – С. 45–47.
5. *Дячок Ю. В., Дмитриев А. П., Гродзінський Д. М.* Роль Ca^{2+} как вторичного мессенджера в индукции синтеза фитоалексинов и каллозы в культуре клеток *Allium cepa* L // Физиол. растений. – 1997. – **44**. – С. 385–391.
6. *Ємельянов В. І., Кравчук Ж. Н.* Сравнительная характеристика индукции каллозообразования в суспензионных культурах клеток лука и томата // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. – 2001. – **2**. – С. 235–241.
7. *Ємельянов В. І., Ноздренко Д. М., Семенець В. А.* Участь кальцієвої сигнальної системи в індукованому накопиченні калози та зростанні хітиназної активності // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Пробл. регуляції фізіол. функцій. – 2006. – **11**. – С. 47–49.
8. *Ємельянов В. І., Дмитриев А. П.* Индуцированное увеличение хитиназной активности в клетках томатов (*Lycopersicon esculentum* L.) // Цитология и генетика. – 2007. – **5**. – С. 27–31.
9. *Ємельянов В. І., Кравчук Ж. Н., Поляковский С. А., Дмитриев А. П.* Отложение каллозы при обработке клеток томатов (*Lycopersicon esculentum* L.) биотическими элиситорами // Там же. – 2007. – **6**. – С. 39–46.
10. *Blume B., Nurnberger T., Nass N., Scheel D.* Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley // Plant Cell. – 2000. – **12**. – P. 1425–1440.
11. *Trewavas A. J., Malho R.* Ca^{2+} signaling in plant cells: the big network! // Curr. Opin. Plant Biol. – 1998. – **1**. – P. 428–433.
12. *Neuhaus G., Bowler C., Kern R., Chua N.-H.* Calcium/calmodulin-dependent and independent phytochrome signal transduction pathways // Cell. – 1993. – **73**. – P. 937–952.
13. *Mayama S., Tani T., Ueno T. et al.* The purification of victorin and its phytoalexin elicitor activity in oat leaves // Physiol. and Mol. Plant Pathol. – 1986. – **29**. – P. 1–18.
14. *Дмитриев А. П.* Сигнальные системы иммунитета растений // Цитология и генетика. – 2002. – **36**. – С. 58–68.