

І. В. Покотило, Я. Мартінець, В. С. Кравець

Регуляція активності фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С за умов дії чинників біотичного стресу у рослин

(Представлено членом-кореспондентом НАН України А. І. Вовком)

*Визначено вплив чинників біотичного стресу на активність фосфатидилхолін-гідролізуючої фосфоліпази С (ФХ-ФЛС) суспензійної культури клітин тютюну та зміну експресії генів ФХ-ФЛС рослин *Arabidopsis*. Виявлено зниження рівня продукції вторинного месенджеру діацилгліцеролу за участю ФХ-ФЛС у відповідь на дію саліцилової кислоти та еліситорів (ліпополісахаридів та бензотіадіазолу). Показано, що дія метилжасмонату не обумовлює змін активності ФХ-ФЛС. Встановлено залучення ФХ-ФЛС в реалізацію механізмів дії чинників біотичного стресу на рівні змін ферментативної активності ФХ-ФЛС та експресії генів ФХ-ФЛС.*

Рослини характеризуються високою здатністю до адаптації, спроможні реагувати на сигнали навколишнього середовища доквілля та активувати захисні реакції метаболізму. Умови біотичного стресу, що зумовлені контактом з патогенними мікроорганізмами, становлять серйозну загрозу для життєдіяльності та продуктивності рослин. Незважаючи на відсутність спеціалізованих імунних клітин, рослини можуть реалізовувати захисні реакції на рівні вегетативних тканин та органів [1]. Крім первинного механічного захисту, який забезпечується кутикулою та восковим шаром, їм також притаманні механізми індукованої стійкості у відповідь на розпізнавання специфічних молекул патогенів (еліситорів та ефекторів) на рівні рецепторних білків клітин рослин [1]. Активація даних систем спричинює синтез антимікробних метаболітів, експресії генів PR (Pathogenesis-related) та накопичення стресових гормонів — саліцилової (СК) та жасмонової кислот (ЖК). У подальшому ці гормони забезпечують розвиток системної стійкості на рівні цілісного організму рослини.

Фосфоліпази безпосередньо залучені у контроль імунних реакцій рослин [2]. Вони є мономерними фосфодіестеразами, що забезпечують гідроліз фосфоліпідів та продукцію біологічно активних сполук ліпідного походження (процес ліпідного сигналіngu). Фосфатидилхолін-гідролізуючі фосфоліпази С (ФХ-ФЛС) здатні розщеплювати типовий фосфоліпід мембран — фосфатидилхолін — з утворенням діацилгліцеролу (ДАГ) та фосфохоліну. Пряма сигнальна роль ДАГ у клітинах рослин, на відміну від такої у тварин, потребує експериментального підтвердження [3]. Натомість було встановлено, що за умов дії біотичного стресу ДАГ є залученим до шляхів продукції фосфатидної кислоти (ФК) — біоактивного ліпиду клітин рослин [4, 5]. Внутрішньоклітинна дія стресових гормонів (СК та ЖК) також може опосередковуватись на рівні ліпідного сигналіngu. У зв'язку з цим було показано різноспрямовану роль фосфоліпази Дβ1 у СК-залежних захисних реакціях *Arabidopsis* на дію біотрофних патогенів та ЖК-залежних реакціях на дію некротрофних патогенів [6]. Однак молекулярні механізми залучення фосфоліпаз у механізми регуляції імунної відповіді рослин залишаються маловивченими.

© І. В. Покотило, Я. Мартінець, В. С. Кравець, 2014

Метою даного дослідження було з'ясування участі ФХ-ФЛС у захисних реакціях рослин за умов дії чинників біотичного стресу та стресових гормонів у суспензійній культурі клітин тютюну та рослинах *Arabidopsis*.

Експериментальна частина. Об'єктом дослідження змін активності ФХ-ФЛС та продукції ДАГ була суспензійна культура клітин тютюну (*N. tabacum* cv. BrightYellow — 2). Середовище культивування містило 4,3 г/л солей MS ("Sigma"), 1 г/л тіаміну, 200 мг/л KH_2PO_4 , 100 мг/л міоїнозиту, 30 г/л сахарози та 0,9 мкмоль/л 2,4-дихлорфеноксіацетату (рН 5,8). Клітини вирощувалися в темряві при 26 °С на обертальному шейкері. Для експериментів використовувалися тридобові клітини суспензійної культури, що нормалізовані до концентрації сирової маси 0,056 г/мл. Клітини інкубувалися з 0,66 мкг/мл флуоресцентного фосфатидилхоліну (Invitrogen) впродовж 10 хв. Після завершення інкубації ліпіди екстрагували сумішню метанол:хлороформ 2 : 1 з подальшим розділенням фаз шляхом додаванням 1 моль/л розчину КСl. Виділені ліпіди наносили на силікагелеві пластини для тонкошарової хроматографії (ТШХ) та розділяли у горизонтальній хроматографічній камері сумішню хлороформ : метанол : вода 65 : 25 : 4 V/V/V. Визначення продуктів гідролізу фосфатидилхоліну проводили за допомогою стандартів. З метою кількісного підрахунку продуктів гідролізу силікагелеві пластини сканувались лазерним флуоресцентним сканером FLA-7000 ("Fujifilm").

Аналіз експресії генів ФХ-ФЛС проводився з використанням рослин *Arabidopsis thaliana*, які вирощували впродовж 4 тижнів у ґрунтовій суміші. Суспензія бактерій (*P. syringae* pv *maculicola*, $1 \cdot 10^5$ бактерій на мілілітр у розчині 10 ммоль/л MgCl_2) інокулювалась у листковій пластинці. Після 24 год експозиції тканини заморожувались у рідкому азоті. Ізоляцію РНК та реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням наборів реактивів (Spectrum Plant Total RNA Kit, Sigma-Aldrich; Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche). Кількісну полімерну ланцюгову реакцію здійснювали з використанням флуоресцентного зонда SYBR Green I та системи LightCycler 480 ("Roche"). Як референтний брали ген UBQ10 *Arabidopsis*.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати аналізу експериментальних даних свідчать про диференційну регуляцію активності ФХ-ФЛС та експресії генів ФХ-ФЛС в умовах дії чинників біотичного стресу та стресових гормонів. У процесі дослідження було встановлено, що активність ФХ-ФЛС знижувалась на 40% за умов дії СК впродовж 60 хв (рис. 1). Натомість дія метилового ефіру жасмонової кислоти — метилжасмонату (МЖ) — впродовж 60 хв не викликала істотних змін активності ФХ-ФЛС (рис. 2).

Фосфоліпази є одними з ключових факторів стійкості рослин в умовах ураження патогенами [7]. Регуляторна активність фосфоліпаз у клітинах опосередковується продукцією вторинних месенджерів ліпідної природи. Серед них — ФК та ДАГ. Відомо, що ФК здатна зв'язуватися з низкою білків рослин, зокрема НАДФН-оксидази, що є ключовими ферментами продукції активних форм кисню в умовах стресів [8]. У свою чергу ДАГ — зчеплений з мембранами та здатен істотно модифікувати їх біофізичні властивості [3].

Відомо, що активність фосфоліпаз рослин змінюється у відповідь на дію стресових гормонів. Дія СК обумовлювала активацію фосфоліпази Д у суспензійній культурі клітин *Arabidopsis* [9], тоді як МЖ стимулював активність фосфоліпази Д та фосфатидилінозитолспецифічних фосфоліпаз С [10]. СК — гормон, який накопичується в тканинах рослин в умовах дії стресів та обумовлює розвиток вторинних захисних реакцій [11]. Цікаво відзначити, що дія біологічно неактивного аналога СК — 4-гідроксибензойної кислоти (4-ГБК) — не обумовлювала істотних змін активності ФХ-ФЛС у наших дослідженнях (див. рис. 1).

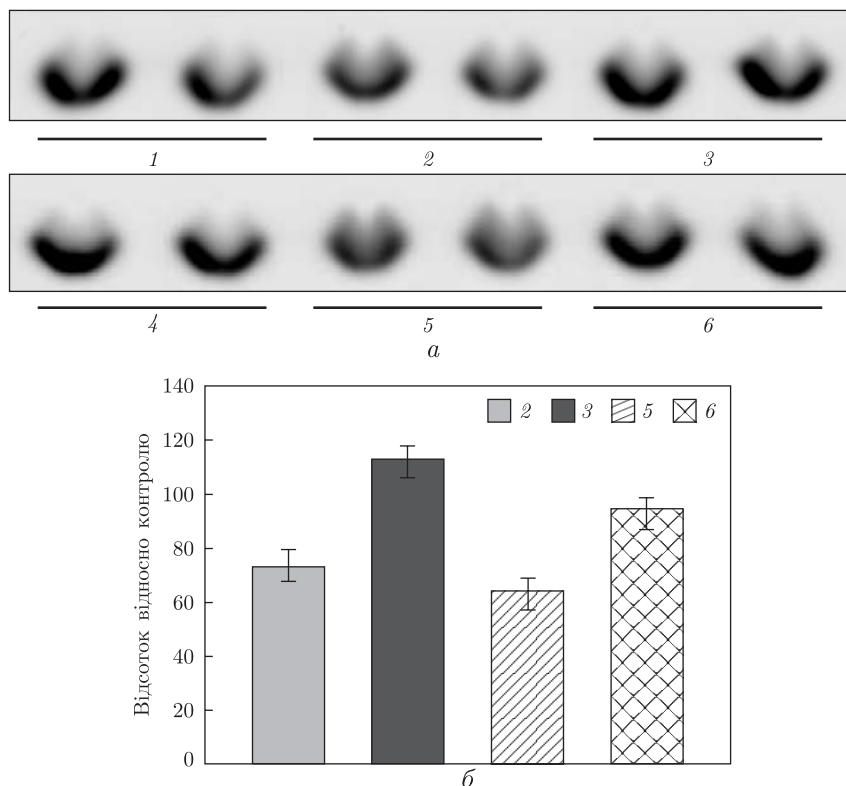


Рис. 1. Вплив СК та 4-ГБК на активність ФХ-ФЛС у клітинах тютюну.
 а: Зони ДАЗ на пластині ТШХ; б: підрахунок абсолютної флуоресценції зон ДАЗ дослідних проб відносно контролю.
 1 — Контроль (30 хв); 2 — СК 0,5 ммоль/л (30 хв); 3 — 4-ГБК 0,5 ммоль/л (30 хв); 4 — контроль (60 хв);
 5 — СК 0,5 ммоль/л (60 хв); 6 — 4-ГБК 0,5 ммоль/л (60 хв)

Це свідчить про те, що зниження активності ФХ-ФЛС у відповідь на дію СК опосередковане вторинними механізмами трансдукції сигналів та вказує на залучення ФХ-ФЛС рослин у процеси реалізації внутрішньоклітинної дії даного гормону [11]. ЖК є іншим ключовим фітогормоном, що контролює перебіг адаптаційних реакцій метаболізму у відповідь на дію патогенних, а також симбіотичних мікроорганізмів [12]. Антагоністичні взаємовідносини СК й ЖК за умов дії біотичного стресу добре відомі. Згідно з останніми даними, СК пригнічує експресію ЖК-асоційованих генів шляхом негативної регуляції активатора транскрипції ORA59 [13]. Отримані нами експериментальні дані вказують на те, що ФХ-ФЛС бере участь у реалізації внутрішньоклітинної дії лише однієї з двох ланок антагоністичної системи трансдукції сигналів жасмонатів та СК.

У ході роботи також було показано, що активність ФХ-ФЛС істотно знижувалась у відповідь на дію еліситорів — ліпополісахаридів (ЛПС) та S-метилового ефіру бензо-(1,2,3)-тіадіазол-7-карботіонової кислоти (бензотіадіазолу, БТД) (рис. 3). Еліситори є важливими молекулами, рецепція яких дозволяє рослинам ідентифікувати присутність патогенних організмів. Серед найпоширеніших еліситорів — ЛПС клітинних стінок бактерій, що сприймаються рослинною клітиною за участю білків PRR (Pattern Recognition Receptors) [14]. В свою чергу, БТД є штучним еліситором та індуктором резистентності рослин. Його дія на організм рослин обумовлює, крім інших ефектів, індукцію експресії генів PR та систем-

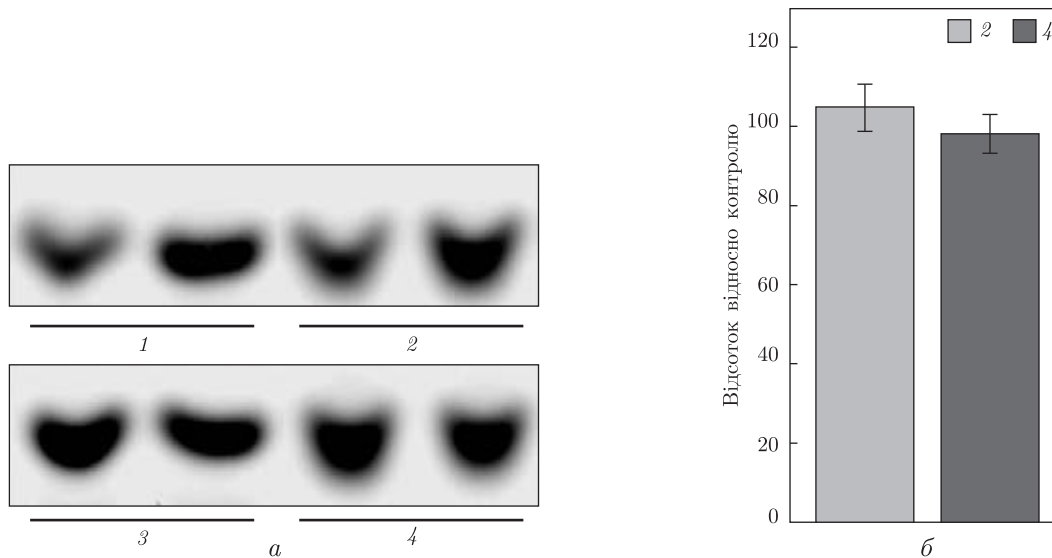


Рис. 2. Вплив МЖ на активність ФХ-ФЛС у клітинах тютюну.
a: Зони ДАГ на пластині ТШХ; *б*: підрахунок абсолютної флуоресценції зон ДАГ дослідних проб відносно контролю.

1 – Контроль (30 хв); 2 – МЖ 0,5 ммоль/л (30 хв); 3 – контроль (60 хв); 4 – МЖ 0,5 ммоль/л (60 хв)

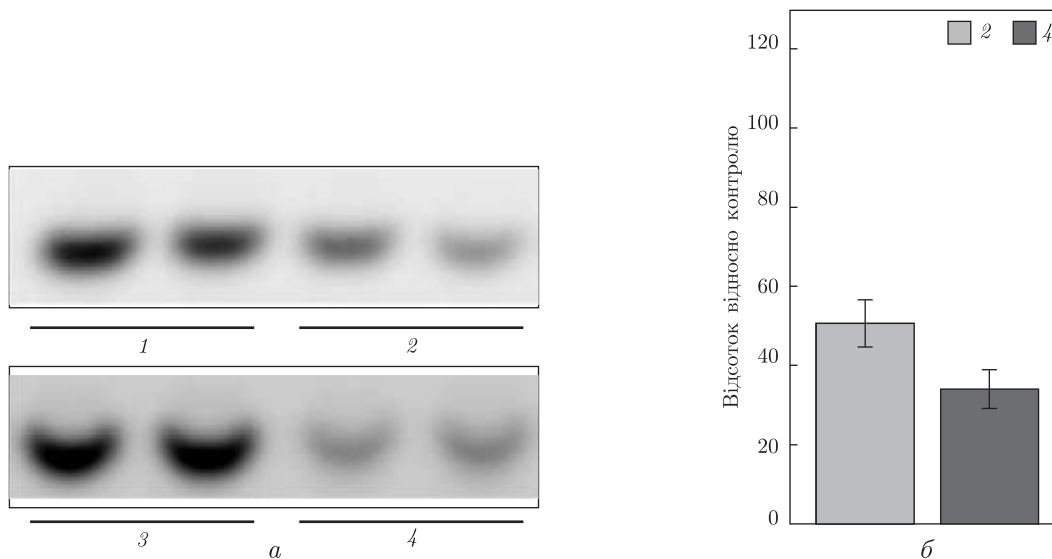


Рис. 3. Вплив ЛПС та БТД на активність ФХ-ФЛС у клітинах тютюну.
a: Зони ДАГ на пластині ТШХ; *б*: підрахунок абсолютної флуоресценції зон ДАГ дослідних проб відносно контролю.

1 – Контроль (60 хв); 2 – ЛПС 100 мг/л (60 хв); 3 – контроль (30 хв); 4 – БТД 1 ммоль/л (30 хв)

ної резистентності рослин [15]. Отримані нами дані свідчать про те, що шляхи сприймання еліситорів у клітинах рослин відбуваються за участю ФХ-ФЛС та подібні то таких, що реалізуються за умов дії СК [11].

Відомо, що зміна активності фосфоліпаз може відбуватись як внаслідок посттрансляційних змін, так і в результаті зміни експресії генів ФХ-ФЛС. У наших дослідженнях спосте-

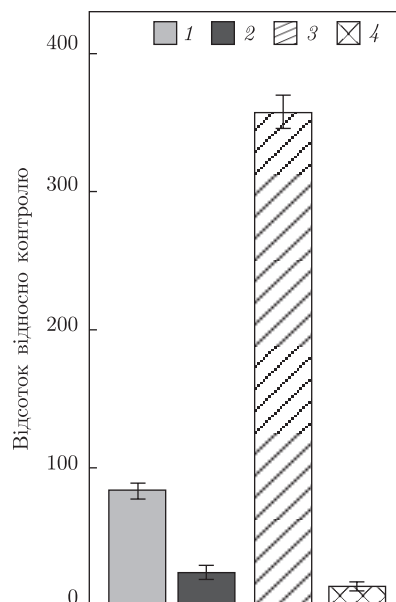


Рис. 4. Рівень експресії генів ФХ-ФЛС *Arabidopsis* після 24 год у відповідь на інокуляцію *P. Syringae* pv *maculicola*.

1 – ФХ-ФЛС1; 2 – ФХ-ФЛС3; 3 – ФХ-ФЛС4; 4 – ФХ-ФЛС6

рігальсь різноспрямована регуляція експресії вказаних генів ФХ-ФЛС *Arabidopsis* за умов ураження патогенною бактерією *P. syringae* (рис. 4). Рівень експресії ізогену ФХ-ФЛС4 був значно підвищеним після 24 год експозиції до дії патогену. Натомість експресія ізогенів ФХ-ФЛС3 та ФХ-ФЛС6 в ідентичних умовах була пригніченою (див. рис. 4). Отримані результати свідчать про те, що диференційні зміни ферментативної активності ФХ-ФЛС в умовах біотичного стресу опосередковуються на рівні зміни експресії генів ФХ-ФЛС. Отримані дані молекулярно-генетичних досліджень також вказують на існування механізмів регуляції адаптаційних реакцій в стресових умовах, які залучають індивідуальні ізогени ФХ-ФЛС.

Таким чином, результати проведених досліджень дали змогу встановити, що на початкових етапах дії чинників біотичного стресу та стресових гормонів у рослин спостерігається зміна активності продукції ДАГ за участю ФХ-ФЛС, а також диференційна регуляція експресії генів ФХ-ФЛС. Отримані нами дані свідчать про залучення ФХ-ФЛС, а також вторинного месенджера ДАГ, продукцію якого вона забезпечує, в процесі трансдукції сигналів та ініціації адаптивних реакцій рослинного організму за умов біотичного стресу.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України (№ 2.1.10.32–10 та № 9.1–12(06)).

1. Wirthmueller L., Maqbool A., Banfield M. J. On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions // *Nat Rev Micro.* – 2013. – **11**, No 11. – P. 761–776.
2. Canonne J., Froidure-Nicolas S., Rivas S. Phospholipases in action during plant defense signaling // *Plant Signal. & Behav.* – 2011. – **1**, No 6. – P. 13–18.
3. Pokotylo I., Pejchar P., Potocký M. et al. The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signalling // *Prog. Lipid Res.* – 2013. – **1**, No 52. – P. 62–79.
4. Raho N., Ramirez L., Lanteri M. L. et al. Phosphatidic acid production in chitosan-elicited tomato cells, via both phospholipase D and phospholipase C/diacylglycerol kinase, requires nitric oxide // *J. Plant Phys.* – 2011. – **6**, No 168. – P. 534–539.

5. Monaghan J., Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – 4, No 15. – P. 349–357.
6. Zhao J., Devaiah S. P., Wang C. et al. *Arabidopsis* phospholipase D β 1 modulates defense responses to bacterial and fungal pathogens // *New Phytologist.* – 2013. – 1, No 199. – P. 228–240.
7. Pinosa F., Buhot N., Kwaaitaal M. et al. *Arabidopsis* Phospholipase D δ is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi // *Plant Phys.* – 2013. – 2, No 163. – P. 896–906.
8. Zhang Y., Zhu H., Zhang Q. et al. Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis* // *Plant Cell Online.* – 2009. – 8, No 21. – P. 2357–2377.
9. Rainteau D., Humbert L., Delage E. et al. Acyl chains of phospholipase D transphosphatidylation products in *Arabidopsis* cells: A study using multiple reaction monitoring mass spectrometry // *PLoS ONE.* – 2012. – 7, No 7. – P. e41985.
10. Profotová B., Burketová L., Novotná Z. et al. Involvement of phospholipases C and D in early response to SAR and ISR inducers in *Brassica napus* plants // *Plant Phys. and Biochem.* – 2006. – 2./3, No 44. – P. 143–151.
11. Campos L., Granell P., Tárraga S. et al. Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens // *Ibid.* – 2014. – No 77. – P. 35–43.
12. Plett J. M., Khachane A., Ouassou M. et al. Ethylene and jasmonic acid act as negative modulators during mutualistic symbiosis between *Laccaria bicolor* and *Populus* roots // *New Phytologist.* – 2014. – 1, No 202. – P. 270–286.
13. Van der Does D., Leon-Reyes A., Koornneef A. et al. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59 // *Plant Cell Online.* – 2013. – 2, No 25. – P. 744–761.
14. Erbs G., Newman M.-A. 2011. – Lipopolysaccharide and its interactions with plants // *Bacterial Lipopolysaccharides* / Ed. by Y. A. Knirel, M. A. Valvano. – Vienna: Springer. – 2011. – P. 417–433.
15. Lee B., Park Y. S., Yi H. S., Ryu C. M. Systemic induction of the small antibacterial compound in the leaf exudate during benzothiadiazole-elicited systemic acquired resistance in pepper // *Plant Pathol. J.* – 2013. – 3, No 29. – P. 350–355.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України, Київ
Інститут експериментальної ботаніки
АН Чеської Республіки, Прага

Надійшло до редакції 29.04.2014

И. В. Покотило, Я. Мартинец, В. С. Кравец

Регуляция активности фосфатидилхолин-гидролизующих фосфолипаз С при действии факторов биотического стресса у растений

Определено влияние факторов биотического стресса на активность фосфатидилхолин-гидролизующих фосфолипаз С (ФХ-ФЛС) суспензионной культуры клеток табака и изменение экспрессии генов ФХ-ФЛС Arabidopsis. Установлено снижение уровня продукции вторичного мессенджера диацилглицерола при участии ФХ-ФЛС в ответ на действие салициловой кислоты и элиситоров (липолисахаридов и бензотиадиазола). Показано, что действие метилжасмоната не обуславливало изменения активности ФХ-ФЛС. Определено вовлечение ФХ-ФЛС в реализацию механизмов действия факторов биотического стресса на уровне изменения ферментативной активности ФХ-ФЛС, а также экспрессии генов ФХ-ФЛС.

Regulation of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C activity under the influence of biotic stress effectors in plants

The influence of biotic stress effectors on the activity of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C (PC-PLC) in tobacco suspension cell culture and the level of PC-PLC genes expression in Arabidopsis has been demonstrated. A decrease in the level of diacylglycerol second messenger production by PC-PLC has been detected in response to the treatment with either salicylic acid or elicitors (lipopolysaccharides and benzotiadiazol). The treatment with methyl jasmonate has not influenced the activity of PC-PLC. An implication of PC-PLC to the mechanisms of biotic stress effectors action has been disclosed on the levels of changes to enzymatic activity of PC-PLC and gene expression of PC-PLC.