

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.03.110>

УДК 581: 581.1: 581.2: 581.5: 581.137.3: 576.3

В.И. Емельянов, С.А. Поляковский, В.И. Сакада,

Д.М. Гродзинский, акад. НАН Украины

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

E-mail: vldeml@ukr.net

Растительные клетки формируют свои защитные структуры из молекул фитопатогенных микроорганизмов

*Растительные клетки способны формировать свои структуры за счет молекул, входивших в состав клеточных стенок патогенных для них грибов. Авторадиографический анализ показал наличие ^{14}C -глюкозы в структурах клеток лука, которая до этого входила в состав клеточных стенок патогенного гриба *Botrytis cinerea*. Радиоизотопный метод позволил определить наличие меченой глюкозы в структурах клеток *Allium cepa*, в частности защитного β -1,3-глюкана – каллозы.*

Ключевые слова: растительные клетки, фитопатогенные микроорганизмы, *Allium cepa*, *Botrytis cinerea*, каллоза.

Растения обладают комплексом эволюционно закрепленных механизмов защиты от патогенных для них микроорганизмов. В системе растение – патоген на первых этапах взаимодействия важную роль играют конституционные гидролитические ферменты – глюканазы и хитиназы [1]. Основной функцией этих ферментативных комплексов является разрушение молекул полимеров, которые формируют клеточные стенки грибов, и высвобождение из них сигнальных молекул – элиситоров [2], олигомеров и мономеров сахаров.

Элиситоры, связываясь с рецепторами плазматической мембраны [3], по мере повышения их концентрации изменяют разность потенциалов между ее внешней и внутренней поверхностью. Достижение критического значения разности потенциалов плазматической мембраны клеток вызывает ее деполяризацию, изменение ионной проницаемости [4], опосредованную вторичными мессенджерами генетически детерминированную индукцию защитных реакций [5]. При низкой концентрации патогена, когда конституционные растительные гидролазы способны утилизировать все его структуры до моносахаров, генетически детерминированного защитного ответа не происходит [6, 7], так как в периплазматическом пространстве будут отсутствовать элиситор-активные олигомеры. Растительные клетки при этом получают потенциальный “сахарный” ресурс, который могут использовать для собственных нужд. Локальная сборка полимерной цепи β -1,3-связанной глюкозы в зоне контакта со структурами патогена – одна из реакций потенциального использования этих гексоз [6].

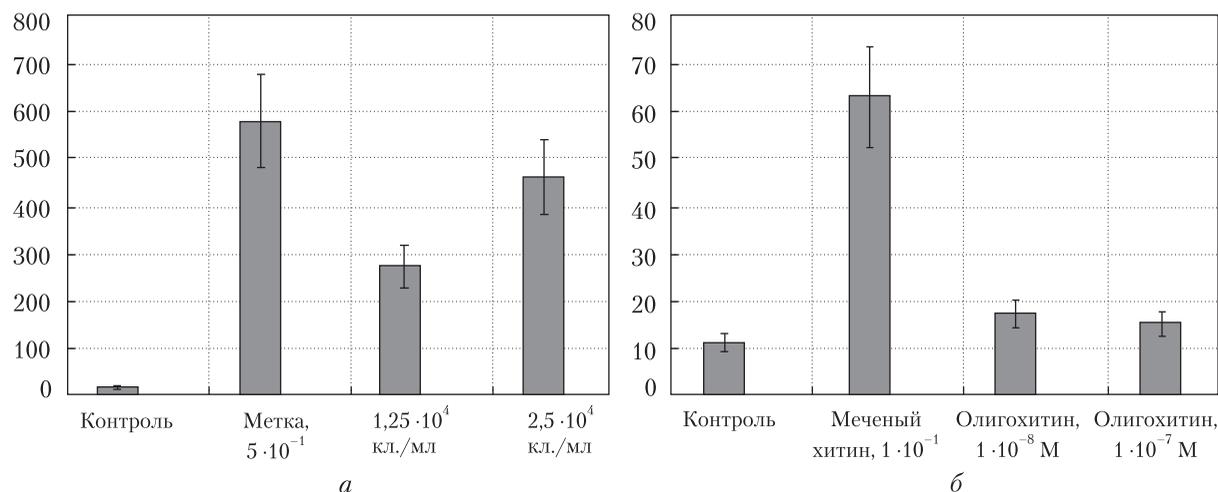
В работах многих авторов показан Ca^{2+} зависимый путь синтеза каллозы как генетически детерминированного ответа, однако известно также, что в растительных клетках всег-

да присутствует некоторое конституционное количество данного глюкоана, которое зачастую составляет 10–20 % максимально синтезируемого у растений в ответ на биотический стресс [8]. Таким образом, вполне вероятно, что продукты ферментативного гидролиза могут использоваться растительными клетками для сборки β -1,3-полимерной цепи глюкозы в местах локального патогенеза [9]. Для этого трансмембранный трехдоменный комплекс каллозосинтазы [4] должен иметь внешние рецепторные участки, которые опосредованно изменению своего электрохимического потенциала (заряда) приведут к конформационным изменениям и активации работы его каталитического домена, либо, как вариант, ферментативный комплекс может “включаться” просто при наличии субстрата.

В настоящей работе рассмотрен вопрос патогениндуцированного формирования механического защитного барьера каллозы в клетках чешуй *Allium cepa* при инокуляции неспецифическим патогенным луком — *Botrytis cinerea*. Показан путь реализации растительными клетками локального механического защитного барьера, рассмотрен механизм его формирования. В работе [6] была выдвинута гипотеза о том, что накопление каллозы, как защитной реакции, может осуществляться без включения сигнальных систем [7] и деполяризации плазматической мембраны, а лишь благодаря локальной сборке полимерной цепи β -1,3-связанной глюкозы из молекул разрушенных фрагментов клеточной стенки патогена. Предложен оригинальный способ введения ^{14}C -глюкозы в структуру клеточных стенок патогена *B. cinerea* (за что мы выражаем искреннюю благодарность старшему научному сотруднику отдела биофизики и радиобиологии Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины Н.И. Гуще) с последующей инокуляцией спор гриба в клетки чешуй лука.

Материалы и методы. Микробиологическим крючком отбирали необходимое количество культуры клеток гриба и растворяли в 5 мл 0,01 мМ раствора Triton [10]. Ресуспензировали в виброколебателе и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, после чего удаляли надосадочную жидкость, ресуспензировали осадок в 1 мл дистиллированной воды. Затем отмывали центрифугированием в течение 15 мин при тех же оборотах, отбирали надосадочную жидкость и прибавляли стерильную воду для удаления остатков раствора Triton. Последнюю процедуру повторяли трижды. Для проращивания спор *B. cinerea* в пробирки добавляли жидкую питательную среду PDB, содержащую также 2 мкл ^{14}C -глюкозы, и оставляли на 3 ч. По прошествии времени споры отмывали трехкратным центрифугированием в стерильной дистиллированной воде. Количество пророщенных спор подсчитывали в камере Горяева, разбавляли стерильной водой, доводя до необходимых в эксперименте концентраций.

Пророщенные споры патогена добавляли в капельный диффузат, расположенный на поверхности полусфер клеток чешуй лука, ресуспензировали и оставляли во влажной камере на 16 ч, после чего удаляли капельный диффузат с чешуй и вырезали из области инокуляции 300 мг клеток лука, трехкратно отмывали их в 50 мл дистиллированной воды. Для удаления аутофлуоресцентного материала клетки выдерживали час в 70 % растворе этанола, измельчали в фарфоровой ступке с использованием жидкого азота. Каллозу выделяли по методу Каусса [5]. 1 мл раствора экспериментальных образцов, содержащих каллозу, ресуспензировали в 9 мл сцинтилляционной жидкости [11]. Радиоизотопный анализ β -активности проводили на радиометре Rack-Betta.



β-активность каллозы клеток *Allium cepa* после 16-часовой инкубации со спорами неспецифического патогена лука *Botrytis cinerea* (а) и с субстратом – ^3H -полихитином (б)

Результаты и обсуждение. По результатам инкубации неспецифического патогена лука – *B. cinerea* в полусферах чешуй в течение 16 ч установлена способность клеток *A. cepa* использовать ^{14}C -глюкозу, входившую в состав структур клеточной стенки патогенного гриба. Изучение взаимодействия в системе растение – патоген показало способность клеток лука усваивать в среднем 15–20 % ^{14}C -глюкозы, добавленной в среду с прорастающими спорами патогена. В клетки контрольных образцов инокулировали такие же концентрации пророщенных спор грибов без меченого субстрата с последующим выделением из них каллозы в качестве контроля для радиоизотопного анализа. В зависимости от базовой концентрации патогена (рисунок, а), взаимодействие клеток чешуй лука с инокулятом неспецифического патогена *B. cinerea* в концентрациях $1,25 \cdot 10^4$ – $2,5 \cdot 10^4$ клеток/мл приводило к повышению β-активности выделенной из клеток *A. cepa* каллозы в пределах 270–459 β-импульсов в минуту (срм).

Таким образом, за счет активности растительных гидролаз мономеры и, возможно, олигомеры глюкозы с β-1,3-гликозидной связью, “вырезанные” из структур патогена, использовались ферментативным комплексом каллозосинтазы для сборки β-1,3-полиглюкановой цепи – механического защитного барьера растительных клеток. Предположение об использовании входивших в структуру клеточных стенок патогена молекул для формирования собственных защитных структур растительными клетками получило свое подтверждение.

В работе [6] было высказано предположение о возможном пути преобразования полимерной цепи хитина в глюкозу. Результаты исследования элиситориндуцируемого синтеза каллозы показали неспособность клеток чешуй лука трансформировать структуру ^3H -полихитина до глюкозы. Инкубация меченого субстрата, имеющего активность 630 срм, с клетками чешуй лука экспериментальных образцов, предварительно обработанных активными концентрациями элиситоров [5, 11], не повлияла на изменение β-активности каллозы и была соизмерима с контролем (см. рисунок, б).

Результаты эксперимента свидетельствуют об отсутствии способности ферментативного аппарата клеток чешуй *A. cepa* преобразовывать молекулы полимера хитина до глюкозы.

В заключение необходимо отметить, что на примере лука показана способность растительных клеток формировать механический защитный барьер – каллозу из молекул ^{14}C -глюкозы, входивших в состав клеточных стенок патогенного гриба *V. cenerea*. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в процессе эволюции растения приобрели способность использовать молекулярные ресурсы патогенных микроорганизмов для создания собственных структур. В частности, формирование генетически недетерминированного локального механического защитного барьера – каллозы в местах проникновения грибов, несомненно, уменьшает время ответа растительных клеток на биотический стресс, а следовательно, увеличивает резистентность растений к патогенезу. Сборка полицепи β -1,3-глюкана является механизмом снижения энтропии системы за счет упорядочивания [12] разрушенных в ходе обоюдной ферментативной атаки [13] структур. Таким образом, фактически происходит диссипация, которая приводит к образованию новой структуры. Подобный механизм формирования механического защитного барьера, как реакции иммунного ответа, имеет реверсную природу, так как для его реализации необходим только субстрат – разрушенные структуры патогенного микроорганизма в некотором количестве, что, собственно, и вызывает реакцию-ответ. При взаимодействии растения с микромицетами также происходит разрушение структур клеточной стенки растительных клеток, содержащих глюкозу [13]. Вероятно, что комплекс каллосинтазы может восстанавливать и собственные разрушенные патогеном структуры, синтезируя ту же каллозу с последующей возможностью ее преобразования в целлюлозные структуры клеточной стенки [14] в пост-стрессовый период.

Открытый механизм можно называть реакцией локального реверсного накопления каллозы, или, если шире, реакцией локального реверсного иммунитета. Исследования в области генетически недетерминированных реакций ответов, которые не требуют дополнительного синтеза и/или транспорта химических соединений, могут стать перспективным направлением фундаментальных научных исследований с применением полученных результатов в биотехнологии растений.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Емельянов В.И., Дмитриев А.П. Индуцированное увеличение хитиназной активности в клетках томата (*Lycopersicon esculentum* L.). *Цитология и генетика*. 2007. **41**, № 5. С. 27–31.
2. Benhamou N., Joosten M., De Wit P. J. G. M. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.* 1990. **92**. P. 1108–1120.
3. Vaureithel K., Felix G., Boller T. Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes: Competitive inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* 1994. **27**. P. 17931–17938.
4. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. Москва: Наука, 2002. 294 с.
5. Емельянов В.И., Кравчук Ж.Н., Поляковський С.О., Дмитриев А.П. Отложение каллозы при обработке клеток томатов (*Lycopersicon esculentum* L.) биотическими элиситорами. *Цитология и генетика*. 2008. **42**, № 2. С. 21–28.
6. Емельянов В.И. Механизм кальцийнезависимого индуцированного отложения каллозы в растительных клетках. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2010. № 7. С. 146–148.
7. Nishimura M.T., Stein M., Hou B.H., Vogel J.P., Edwards H., Somerville S. Loss of callose synthase result in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*. 2003. **301**. P. 969 – 972.

8. Емельянов В.И., Кравчук Ж.Н. Сравнительная характеристика индукции каллозообразования в суспензионных культурах лука и томата. *Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія*. 2001. **9**. С. 235–241.
9. Kauss H. Callose synthesis. *Membranes: Specialized Functions in Plants*. Guildford: Bios Scientific Publishers, 1996. P. 77–92.
10. Поляковский С.А., Кравчук Ж.Н., Дмитриев А.П. Механизм действия индуктора устойчивости β-аминобутириловой кислоты у *Allium cepa*. *Цитология и генетика*. 2008. **42**, № 6. С. 8–12.
11. Емельянов В.И., Дмитриев О.П., Гродзинский Д.М. Індукція хітиназної активності хітиновими фрагментами різної довжини в суспензійній культурі клітин томату (*Lycopersicon esculentum*). *Допов. Наук. акад. наук Укр.* 1999. № 11. С. 156–158.
12. Кондепуди Д., Пригожин И. Современная термодинамика. От тепловых двигателей до диссипативных структур. Москва: Мир, 2002. 461 с.
13. Дмитриев А.П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. Киев: Наук. думка, 1999. 209 с.
14. Недуха О.М. Калоза: локалізація, функції та синтез. *Цитология и генетика*. 2015. **49**, № 1. С. 61–70.

Поступило в редакцию 28.09.2017

REFERENCES

1. Emelyanov, V. I. & Dmitriev, A. P. (2007). Induced increase in chitinase activity in tomato cells (*Lycopersicon esculentum* L.). *Cytol. Gen.*, 41, Iss. 5, pp. 284-287.
2. Benhamou, N., Joosten, M., De Wit, P. J. G. M. (1990). Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.*, 92, pp. 1108-1120.
3. Baureithel, K., Felix, G. & Boller, T. (1994). Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes: Competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.*, 27, pp. 17931-17938.
4. Tarchevsky, I.A. (2002). Plant cell signaling systems. Moscow: Nauka (in Russian).
5. Emelyanov, V. I., Kravchuk, J. N., Polyakovskiy, S. A. & Dmytriev, A. P. (2008). Callose accumulation under treatment of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cells with biotic elicitors. *Tsitol. Genet.*, 42, No. 2, pp. 21-28 (in Russian).
6. Emelyanov, V.I. (2010). Calcium-independent mechanism of callose synthesis in plant cell. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 7, pp. 146-148 (in Russian).
7. Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H. & Somerville, S. (2003). Loss of callose synthase result in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, 301, pp. 969-972.
8. Emelyanov, V. I. & Kravchuk, J. N. (2001). Callose induce accumulation in suspension cultures of onion and tomato. *Visnyk Dnipropetr. un-tu. Biol. Ecol.*, 9, pp. 235-241 (in Russian).
9. Kauss, H. (1996). Callose synthesis. In *Membranes: Specialized functions in plants* (pp. 77-92). Guildford: Bios Scientific Publishers.
10. Polyakovskiy, S. A., Kravchuk, J. N. & Dmytriev, A. P. The mechanisms of action of plant resistance inductors by the example of *Allium cepa*. *Tsitol. Genet.*, 42, No. 6, pp. 8-12 (in Russian).
11. Emelyanov, V. I., Dmytriev, A. P. & Grodzinskiy, D. M. (1999). Induction of chitinase activity by chitin fragments of different lengths in suspending culture cells of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 11, pp. 156-158 (in Ukrainian).
12. Kondepudi, D. & Prigogine, I. (2002). Modern thermodynamics. From heat engines to dissipative structures. New York: Wiley.
13. Dmytriev, A. P. (1999). Phytoalexins and their role in plant resistance. Kiev: Naukova Dumka (in Russian).
14. Neduha, O. M. (2015). Callose: Localization, functions, and synthesis in plant cells. *Cytol. Gen.*, 49, Iss. 1, pp. 49-57.

Received 28.09.2017

V.I. Emelyanov, S.O. Polyakovskiy, V.I. Sakada, D.M. Grodzinskiy

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: vldeml@ukr.net

РОСЛИННІ КЛІТИНИ ФОРМУЮТЬ СВОЇ ЗАХИСНІ СТРУКТУРИ З МОЛЕКУЛ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Рослинні клітини здатні формувати свої структури за рахунок молекул, що входили до складу клітинних стінок патогенних для них грибів. Авторадіографічний аналіз показав наявність ¹⁴C-глюкози в структурах клітин цибулі, яка до того входила до складу клітинних стінок патогенного гриба *Botrytis cinerea*. Радіоізотопним методом аналізу встановлено наявність міченої глюкози в структурах клітин *Allium cepa*, а саме захисного β-1,3-глюкану — калози.

Ключові слова: рослинні клітини, фитопатогенні мікроорганізми, *Allium cepa*, *Botrytis cinerea*, калоза.

V.I. Emelyanov, S.A. Polyakovskiy, V.I. Sakada, D.M. Grodzinskiy

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: vldeml@ukr.net

PLANT CELLS FORMED THEIR PROTECTIVE STRUCTURES USE MOLECULES OF PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS

During pathogenesis, plant cells are capable to forming their own structures at the expense of the molecules, which were a part of fungi cell walls. Autoradiographic analysis showed the presence of ¹⁴C-glucose in cells of onion, which were recently the compounds of the cell walls *Botrytis cinerea*. Radioisotope method confirmed the presence of labeled glucose in *Allium cepa* cells, the protective poly-β-1,3-glucose – callose.

Keywords: plant cells, phytopathogenic microorganisms, *Allium cepa*, *Botrytis cinerea*, callose.