



УДК 581.1:581.2:581.137.3:576.3

© 2010

В. И. Емельянов

Механизм кальцийнезависимого индуцированного отложения каллозы в растительных клетках

(Представлено академиком НАН Украины Д. М. Гродзинским)

Теоретично обґрунтовано механізм кальцієнезалежного індукованого відкладання калози в системі рослина-патоген. Запропоновано альтернативний шлях синтезу калози в рослинних клітинах, який передбачає використання мономерів цукрів, що входили до складу клітинних стінок патогенного гриба, для формування особистих структур. Розроблено метод перевірки запропонованого механізму в рослинних клітинах.

Растительные клетки имеют эволюционное приспособление поддерживать определенный (конституционный) уровень антимикробных защитных веществ в своих структурах. В периплазматическом пространстве постоянно поддерживается конституционный уровень активности растительных гидролитических ферментов [1], которые играют важную роль в защите растений от микроорганизмов. К ним относятся растительные хитиназы и β -глюканазы. При экспансии патогенных грибов гидролитические ферменты моментально “облепливают” его гифы и без промедлений начинают вычленять из них первичные сигнальные молекулы — биотические элиситоры, фрагменты N-ацетилглюкозамина и β -глюканов соответственно [2]. Наличие элиситоров в периплазматическом пространстве позволяет растительным клеткам быстро реагировать на появление патогена и опосредованно их узнаванию рецепторами плазматической мембраны (ПМ) формировать защитный ответ [3].

Одной из наиболее ранних и важных защитных реакций растительных клеток на инфицирование является механическое укрепление клеточной стенки за счет отложения β -1,3-глюкана — каллозы. Ее вкрапления появляются исключительно в местах контактов растительных клеток с гифами гриба, его секретами или фрагментами клеточных стенок [4]. В синтезе этого глюкана принимает участие ферментативный комплекс каллозосинтаза II [5]. Это трансмембранный белок, который состоит из трех доменов: расположенного на внутренней стороне ПМ — рецепторного (Ca^{2+} -связывающего), трансмембранного — преобразующего и расположенного на внешней стороне ПМ — каталитического [6].

В течение 20 мин после контакта рецепторов ПМ с водорастворимыми элиситорами между ее внешней поверхностью и клеточной стенкой появляются первые вкрапления каллозы [7]. В работе [7] и наших предыдущих исследованиях [8] было показано, что синтез каллозы является Ca^{2+} -зависимым процессом, активирующимся не через генную экспрессию, чем и обусловлено ее быстрое отложение в растительных клетках. Предобработка суспензии клеток верапамилем — блокатором потенциалзависимых кальциевых каналов — вызывала уменьшение индуцированного отложения каллозы у томатов в 1,6 раза, а у лука — в 4 раза. Предварительная обработка клеток хелатором ионов кальция — ЕГТА приводила к уменьшению ее индуцируемого накопления в обеих культурах до 17% у томатов и 21% у лука [9]. Эти результаты указывают на то, что $\sim 80\%$ индуцируемого отложения каллозы в растительных клетках происходит опосредованно поступлению в клетки ионов Ca^{2+} , которое осуществляется по потенциалзависимым каналам, что, в свою очередь, активирует комплекс каллозосинтазы II. Следовательно, для синтеза этих $\sim 80\%$ каллозы необходима последовательная деполяризация ПМ и изменение ионных токов клетки, что приводит к конформационным изменениям белковых молекул и следующей за этим реакцией-ответом [6]. Таким образом, при попадании ионов кальция в цитоплазму происходит их связывание с рецепторным доменом каллозосинтазы II, что приводит к последовательной активации каталитического домена ферментативного комплекса. Последнее приводит к синтезу клеткой защитного глюкоана — каллозы. Если предположить, что реакция отложения каллозы — процесс исключительно Ca^{2+} -зависимый, тогда для синтеза оставшихся $\sim 20\%$ клетка должна задействовать кальций внутриклеточного пула. В работе [7] показано, что при ингибировании периплазматического и внутриклеточного кальциевых депо, перед добавлением элиситора, клетки лука были способны накапливать еще $\sim 10\%$ этого глюкоана. Таким образом, синтез каллозы продолжался, несмотря на отсутствие кальциевого сигнала в цитоплазме растительных клеток, что указывает на возможное существование у них, как минимум, еще одного альтернативного пути индуцированного отложения каллозы — Ca^{2+} -независимого.

Анализ вышеупомянутых экспериментальных работ позволил нам предложить следующую возможную последовательность развития событий. Водорастворимые элиситоры, взаимодействуя с внеклеточными углеводсенситивными рецепторными участками каллозосинтазы II или связанными с ней рецепторными участками плазмалеммы, изменяют заряд в рецепторном домене, что приводит к конформационным изменениям всего ферментативного комплекса (без участия ионов кальция!) и переводит его, таким образом, в активное каталитическое состояние. Последнее способствует быстрому Ca^{2+} -независимому синтезу каллозы.

Подобная схема косвенно подтверждается работой Нишимура с соавт. [10], где показано, что в случае быстрого отложения каллозы на ранних стадиях инфицирования могут репрессироваться поздние защитные реакции, т. е. включение реакции синтеза каллозы не предполагает деполяризацию ПМ и, соответственно, поступление ионов кальция в цитоплазму. Как следствие, растительная клетка не включает системы вторичных мессенджеров (сигнальных систем) для последовательной передачи сигнала активации защитных реакций и синтеза защитных веществ. Стоит еще раз заострить внимание на том, что успешная реализация реакций иммунного ответа в растительных клетках априори предусматривает участие сигнальных систем [6]. Следовательно, синтез и транспорт глюкозы к месту отложения рассматриваемого глюкоана для реализации реакции отложения каллозы будет не возможен. Тогда остается невыясненным, откуда клетка может получать молекулы сахаров

для синтеза каллозы без участия сигнальных систем. При таком положении вещей, на наш взгляд, клетке остается один — альтернативный путь получения глюкозы из окружающего их периплазматического пространства. В работах [2, 11] показано, что растительные гидролазы вырезают из структур патогенного гриба олигомеры и мономеры сахаров. Таким образом, у растительной клетки появляется материал для сборки полицепи 1,3-связанной глюкозы (каллозы).

Из вышерассмотренного следует вывод, что растительные клетки могут использовать мономеры сахаров, которые были “добыты” их гидролазами, для формирования собственных структур, что является для них энергетически выгодным, а значит целесообразным. На наш взгляд, также не исключена возможность преобразования растительными ферментативными комплексами “вырезанных” гидролазами молекул с их последующим включением и в другие клеточные структуры. Из всего вышеизложенного следует, что синтез каллозы каллозосинтазой II может осуществляться из молекул, еще недавно входивших в структуры патогенного для растений гриба.

Подтвердить или опровергнуть последнее можно при использовании метода меченых субстратов. Прибавив к суспензии растительных клеток субстрат для растительных гидролаз — ^{14}C -полиглюкана и/или ^{14}C -полихитина, провести радиобиологический анализ на наличие/отсутствие меченых молекул в каллозе.

1. 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.
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. Дмитрієв А. П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. – Киев: Наук. думка, 1999. – 209 с.
4. Kauss H. Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions // The Plant Plasma Membrane – Structure, Function and Molecular Biology. – Berlin: Springer, 1990. – P. 126–143.
5. Kauss H. Callose synthesis // Membranes: Specialized Functions in Plants. – Guildford, UK: Bios Sci. Publ., 1996. – P. 77–92.
6. Тарчевський І. А. Сигнальные системы клеток растений. – Москва: Наука, 2002. – 294 с.
7. Дячок Ю. В., Дмитрієв 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.
8. 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. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2006. – 11. – С. 47–49.
9. Ємельянов В. І., Кравчук Ж. Н. Сравнительная характеристика индукции каллообразования в суспензионных культурах лука и томата // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2001. – 9. – С. 235–241.
10. Nishimura M. T., Stein M., Hou B. H. et al. Loss of callose synthase result in salicylic acid-dependent disease resistance // Science. – 2003. – 301. – P. 969–972.
11. Baureithel K., Felix G., Boller T. 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. – 1994. – 269, No 27. – P. 17931–17938.

V. I. Emelyanov

Calcium-independent mechanism of callose synthesis in plant cells

The calcium-independent mechanism of callose deposition in the plant-pathogen system is theoretically established. The alternative pathway of the callose synthesis in plant cells with the use of sugar monomers which had been contained in fungal cell walls is proposed. The method for verification of the alternative mechanism is developed.