НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису

УДК 576.535:577.121

ДЯЧОК Юлія Віленівна

РОЛЬ Ca^{2+} ЯК ВТОРИННОГО МЕСЕНДЖЕРА В ІНДУКЦІЇ ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН *Allium cepa* L.

03.00.25 — клітинна біологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1995

576

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії імунітету рослин

Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
ДМИТРІЄВ Олександр Петрович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
САРНАЦЬКА Вереса Василівна

кандидат біологічних наук
ПОГРЕБНЯК Наталія Яківна

Провідна організація: Національний Університет ім.Т.Шевченка

Захист дисертації відбудеться "13" X 1995 р. о 10 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.19.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: Київ, вул. Заболотного, 148.

Поштова адреса: 252143, Київ – 143, вул. Заболотного, 148, ІКБГІ НАНУ

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці інституту

Автореферат розісланий "13" IX 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук **Л.В. Малишева**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Застосування хімічних засобів захисту рослин, незважаючи на ефективність, має багато негативних наслідків, пов'язаних, в першу чергу, із забрудненням навколишнього середовища. Тому в багатьох лабораторіях світу проводяться інтенсивні пошуки екологічно безпечних засобів захисту рослин. Успіх цих пошуків багато в чому залежить від з'ясування молекулярних механізмів, які лежать в основі фітоімунітету. У відповідь на спробу інфікування рослини включають механізми індукованої стійкості, до числа яких належать: синтез низькомолекулярних антибіотичних речовин — фітоалексинів (ФА) (Bailey, Mansfield, 1982, Метлицкий, Озерецковская, 1986), синтез патоген-залежних білків (Boller, 1983), відкладення лігніна та калози (Kauss et al., 1991), та ін. Відомо, що індукція захисних реакцій відбувається внаслідок розпізнавання рослиною певних метаболітів патогена — т. з. біогенних еліситорів (Озерецковская и др., 1984; Dixon, Lamb, 1990; Mansfield, 1990). Але молекулярна природа механізмів трансдукції мікробних сигналів в клітинах рослин для активації захисних реакцій залишається невідомою. Останнім часом з'явились дані щодо участі Ca^{2+} в індукції окремих захисних реакцій у рослин (Kurosaki et al., 1987; Kohle et al., 1987) Перевірка гіпотези про кальцієву сигналізацію при розпізнаванні патогена рослиною потребує експериментальних досліджень, супроводжуваних прямими вимірами змін концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} у відповідь на ураження. Корисною модельною системою для проведення таких досліджень є суспензійна культура клітин цибулі (*Allium cepa* L.). В нашій лабораторії було встановлено, що у відповідь на інфікування патогеном *Botrytis cinerea* або на обробку еліситором в тканинах цибулі синтезуються фітоалексини, які були ідентифіковані як 1,3-діон-5-октил-циклопентан

та 1,3-діон-5-гексил-циклопентан (цибуліни 1Д і 2Д) (Дмитрієв та ін., 1987). Іншою захисною реакцією цибулі на спробу інфікування патогенними мікроорганізмами є механічне зміцнення клітинної стінки за рахунок відкладення 1,3-β-глюкана калози. Використовуючи ці дві різні захисні реакції як маркери індукованої стійкості, ми вирішили дослідити участь Ca^{2+} в трансдукції сигналу для реалізації фітоімунної відповіді.

Мета роботи. Робота присвячена вивченню ролі Ca^{2+} як вторинного месенджера в індукції фітоімунної відповіді в культурі клітин цибулі на прикладі двох різних захисних реакцій — синтеза ФА та калози. Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Отримати культуру клітин *Allium cepa* та з'ясувати умови індукції в ній синтезу ФА та калози.

2. Вивчити вплив речовин — агоністів та антагоністів різних етапів шляху кальцієвої сигналізації — на індукцію захисних реакцій в культурі клітин цибулі.

3. За допомогою кальційчутливих флуоресцентних зондів дослідити вплив індукторів захисних реакцій на концентрацію вільного цитоплазматичного Ca^{2+} в клітинах *Allium cepa*.

Наукова новизна і практична цінність роботи. Вперше виділено фітоалексини цибуліни 1Д і 2Д з суспензійної культури клітин *A. cepa*. Підібрані оптимальні умови для індукції синтезу ФА і калози в суспензії клітин цибулі. Виявлена необхідність Ca^{2+} для індукції захисних реакцій в оброблених еліситоромклітинах *A. cepa*. Показана залежність Ca^{2+} струмів через плазматичну мембрану, які виникають внаслідок індукції захисних реакцій, від цАМФ. Вперше за допомогою кальційчутливого флуоресцентного зонду індо-1 доведено виникнення транзієнтного

кальцієвого сигналу в протопластах цибулі у відповідь на обробку еліситором. Визначення ролі Ca^{2+} як вторинного месенджера в індукції захисних реакцій може бути використане для розробки нових, альтернативних методів захисту рослин.

На захист виносяться положення:

1. Суспензійна культура клітин *A. cepa* може бути використана як модельна система для дослідження механізмів трансдукції мікробних сигналів в клітинах рослин для активації захисних реакцій.

2. Ca^{2+} виконує функції вторинного месенджера в індукції двох захисних реакцій – синтезу ФА та утворення калози – в клітинах суспензійної культури *A. cepa*.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи доповідались на 3-му Міжнародному конгресі з молекулярної біології рослин (Тасон, США, 1991); 2-ому Російському симпозіумі "Нові методи біотехнології рослин" (Пущино, 1993); 11-му Міжнародному біофізичному конгресі (Будапешт, Венгрія, 1993); IV-му Європейському конгресі з клітинної біології (Прага, Чехія, 1994); Міжнародному конгресі по рослинним тканинам і культурі клітин (Флоренція, Італія, 1994); 9-му Конгресі Європейської Федерації Спілок фізіологів рослин (Брно, 1994); Міжнародному симпозіумі "Біотехнологія та генетична інженерія рослин" (Київ, 1994); 3-ому Російському симпозіумі "Нові методи біотехнології рослин" (Пущино, 1995); 23-ому З'їзді Федерації Європейських Біохімічних Спілок (Базель, Швейцарія, 1995).

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 8 робіт.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів та їх

обговорення, заключення, висновків та списка літератури, який містить 267 найменувань. Робота представлена на 115 сторінках, містить 31 малюнок та п'ять таблиць.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень була цибуля ріпчаста (*Allium cepa* L.) сорта Сквірський. Експерименти проводили з цибулинами, вегетуючими рослинами і, в основному, з калусною та суспензійною культурами клітин цибулі.

Отримання калусної та суспензійної культур *Allium cepa* проводили за стандартними методиками (Калинин, Сарнацкая, 1978).

Препарат грибного еліситора (КФ) отримували з культурального фільтрату *Botrytis cinerea* після вирощування міцелію гриба на протязі 14 діб на рідкому середовищі Чапека (Перковская, 1991). В дослідах по індукції синтезу ФА 400 мг клітин переносили в скляні конічні колби ємкістю 100 мл, в яких було 20 мл буфера: (А) 0.1 мМ KCl, 0.1 мМ $MgCl_2$, 0.088 М сахарози, pH 5.6 в дослідах з участю ЕГТА; (Б) 1 мМ $CaCl_2$, 0.1 мМ KCl, 0.1 мМ $MgCl_2$, 0.088 М сахарози, pH 5.6 в усіх інших дослідах. Перед перенесенням клітин в безкальцієве середовище, клітини двічи відмивали розчином А із додаванням 5 мМ ЕГТА.

Синтез ФА в суспензії клітин індукували додаванням 1 мл КФ. Сумарний вміст ФА 1Д та 2Д визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на приладі НРС (Чехословаччина) з прямофазною аналітичною колонкою Sepharon SGX в системі гексан-діетиловий ефір (3:1) (Dmitriev et al., 1990). Сумарну кількість ФА 1Д і 2Д розраховували у відносних

одиницях на одиницю ваги сирої маси клітин.

Для індукції синтезу калози клітини з суспензійної культури цибулі, осаджені на капроновому фільтрі (300 мг), ресуспендували в буфері для індукції синтезу калози: 0.1 М тріс/HCl (pH 6.9), який містив 2% сахарози і 5% поживного середовища BDS. Концентрація кальцію становила 1 мМ, крім дослідів за участю EGTA, коли Ca^{2+} в середовищі був відсутній. Синтез калози індукували додаванням хітозану в концентрації 0.2 мг/мл. Вміст калози в екстракті клітин визначали по флуоресценції анілінового блакитного (Kohle et al., 1987) і виражали у мг-еквівалентах пахімана/мг білку.

Протопласти виділяли з пір'я етиольованих рослин цибулі. Для ізоляції використовували 0.5 М розчин сахарози, який містив 1 мМ $CaCl_2$, 0.2% (в/о) целюлізіна, 0.2% (в/о) мацерозима та 0.4% (в/о) онозуки.

Для навантаження флуоресцентного зонду індо-1 використовували протопласти безпосередньо після виділення. Навантаження здійснювали за модифікованим методом Bush and Jones (1987). Для цього протопласти ресуспендували в 1 мл розчину WSB, до якого перед тим додавали 15 мкМ індо-1. Склад розчину: 1 мМ $CaCl_2$, 0.1 мМ $MgCl_2$, 0.1 мМ KCl, 20 мМ галактози, 0.5 М манітолу, 10 мМ диметилглутарової кислоти (pH 4.5). Після навантаження зонду протопласти переносили в розчин вимірювання WSA, аналогічний за складом WSB, але замість диметилглутарової кислоти він містив 10 мМ MES (pH 6.0).

Вимірювання флуоресценції індо-1 в суспензії протопластів проводили на спектрофлуориметрі СДЛ-2 (ЛОМО, Росія); довжина хвилі збудження 350 нм, спектральна ширина щілини 5 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Розробка модельної системи для дослідження механізмів індукції захисних реакцій *Allium cepa*

Отримання культури клітин цибулі *in vitro*

Калусну культуру цибулі вирощували на різних модифікаціях двох середовищ, MS (Murashige, Skoog, 1962) та BDS (Dunstan, Short, 1977).

Оптимальним для росту калуса виявилось середовище BDS IV – середовище BDS з додаванням 3 мг/л 2,4-Д, 0.1 мг/л БАП і 0.5 мг/л НОК, 7.5 мг/л екстракта дріжджів та 250 мг/л гідролізату казеїна. На середовищі BDS IV наприкінці

8-тижневого періоду культивування калус являє собою досить пухку жовту тканину з трохи слизькою поверхнею. Суспензійна культура має вигляд каламутної завісі клітин, яка містить невеликі глобулярні грудки.

Далі треба було з'ясувати, чи накопичуються ФА в калусі цибулі, і підібрати оптимальні умови для індукції їх синтезу.

Синтез ФА в калусній тканині цибулі

Виявилось, що в калусній тканині цибулі при вирощуванні її на агаризованому поживному середовищі BDS IV відбувається синтез ФА 1Д та 2Д.

Для визначення в середовищі компонента, який відіграє роль індуктора накопичення ФА, досліджували залежність накопичення ФА в калусі цибулі, вирощуваному на середовищі BDS IV, від концентрації кожного з гормонів, що

входять до складу цього середовища. Встановлено, що із збільшенням концентрації НОК накопичення ФА зростає. Навпаки, збільшення концентрації 2,4-Д в середовищі інгібує накопичення ФА в калусній тканині. Зміна концентрації БАП не впливала істотно на кількість ФА у калусі *A. cepa*.

Таким чином, в культурі клітин *A. cepa* за певних умов відбувається синтез ФА. Така культура в принципі може бути об'єктом для дослідження індукції захисних реакцій у цибулі. Проте дослідження молекулярних механізмів індукованих захисних реакцій краще проводити на суспензійній культурі клітин. В гомогенній суспензії, на відміну від калуса, всі клітини підпадають під вплив досліджуваних речовин. Тому подальші дослідження проводили на суспензійній культурі клітин *A. cepa*.

2. Індуковані захисні реакції в суспензійній культурі *Allium cepa*

Індукція синтезу ФА в суспензійній культурі клітин *A. cepa*

Виявилось, що спори та культуральний фільтрат фітопатогенного гриба *Botrytis cinerea*, а також деякі пектолітичні ферменти здатні індукувати накопичення ФА в суспензійній культурі клітин цибулі. Найбільшу еліситорну активність виявляла суміш пектолітичних ферментів: 0.1% (в/о) целюлази + 0.1% (в/о) пектинази (26 відн. од./г).

Досліджено динаміку синтезу ФА 1Д та 2Д в суспензійній культурі клітин цибулі, обробленій КФ. Протягом 17 год після обробки КФ накопичення ФА в культурі клітин не відбувається. Максимальне накопичення ФА в культуральному фільтраті клітин *A. cepa* спостерігається через 48 год після додавання еліситора і досягає приблизно 12 відн. од./г, після чого кількість ФА в середовищі поступово зменшується.

Вплив гормонів на індукований синтез ФА в суспензійній культурі *A. cepa*

Кількість ФА, синтезованих суспензією клітин цибулі у відповідь на обробку еліситором КФ, залежить від гормонального складу середовища, на якому вирощували культуру перед додаванням еліситора. Виявилось, що по аналогії з конститутивним синтезом ФА, концентрація в середовищі 2,4-Д > 2×10^{-7} М, інгібувала індукований синтез ФА.

Додавання до поживного середовища крім 2,4-Д ще 5×10^{-7} М НОК або 2×10^{-6} М кінетина частково знімало інгібуючий ефект 2,4-Д на індукований синтез ФА. На рис. 1 видно, що додавання до поживного середовища 3×10^{-5} М 2,4-Д та 2×10^{-6} М кінетина приводить до індукції синтезу ФА у відповідь на обробку еліситором при низькому рівні конститутивного синтезу, тобто дозволяє моделювати в культурі клітин процес індукції синтезу ФА в інтактній рослині.

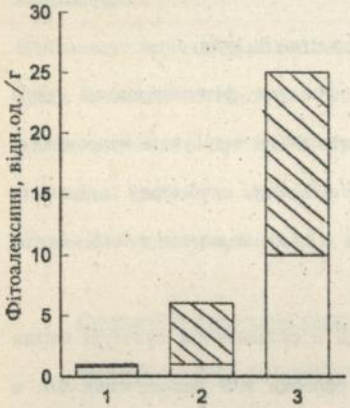


Рис. 1. Синтез ФА в суспензійній культурі *Allium cepa* при різному гормональному складі поживного середовища:
1 — 3 мг/л 2,4-Д;
2 — 3 мг/л 2,4-Д та 0.6 мг/л кінетина;
3 — 3 мг/л 2,4-Д та 1 мг/л НОК;
▯ — конститутивний синтез,
▨ — індукований синтез

Це дозволяє використовувати суспензійну культуру клітин *A. cepa* як модельну систему для вивчення механізмів індукції ФА — відповіді, оскільки вона має три необхідні риси: 1) це гомогенна суспензія; 2) за нормальних умов ФА в ній не синтезуються; 3) ФА синтезуються в суспензійній культурі у відповідь на обробку еліситором.

Для дослідження механізмів трансдукції сигналу при "розпізнаванні" патогена рослиною важливо аналізувати індукцію різних захисних реакцій. Синтез ФА є одним з компонентів комплексної імунної відповіді у *A. cepa*. Іншою важливою захисною реакцією на інфікування патогенними мікроорганізмами є механічне зміцнення клітинної стінки цибулі за рахунок відкладення калози. Тому необхідно було підібрати оптимальні умови для індукції синтезу калози в суспензійній культурі клітин цибулі.

Індукція та флуориметричне визначення вмісту калози в суспензійній культурі клітин цибулі

Обробка суспензійної культури клітин цибулі еліситором хітозаном приводила до збільшення вмісту калози.

Досліджено динаміку відкладення калози в клітинах, оброблених еліситором. Виявилося, що збільшення вмісту калози в оброблених хітозаном клітинах порівняно з контролем відбувається вже через 20 хв після обробки еліситором. Вміст калози в культурі, обробленій еліситором, збільшується майже прямо пропорційно часові і досягає максимума через 7 год. Проведені експерименти дозволили підібрати оптимальні умови для індукції синтезу калози в суспензійній культурі клітин *A. cepa*. В подальших дослідженнях вміст калози в клітинах визначали через 4.5 год після обробки еліситором хітозаном (0.2 мг/мл).

Проведений пошук оптимальних умов для індукції обох захисних реакцій — синтезу ФА та накопичення калози — в суспензійній культурі клітин *A. cepa* дозволяє використовувати цю культуру як модельну систему для вивчення механізмів індукції захисних реакцій, зокрема, визначення вторинних месенджерів при

трансдукції сигналу всередині рослинних клітин.

3. Вплив зовнішньоклітинного Ca^{2+} на індукцію захисних реакцій

Значення зовнішньоклітинного Ca^{2+} для індукції захисних реакцій

Спочатку треба було перевірити, чи є потреба в Ca^{2+} для індукованого еліситорами синтезу ФА і калози. Виявилось, що наявність у поживному середовищі Ca^{2+} є необхідною умовою індукції захисних реакцій в клітинах *A. cepa*. При зв'язуванні вільного Ca^{2+} в середовищі за допомогою 5 мМ ЕГТА синтез ФА, індукований обробкою КФ, блокувався повністю, а індукований хітозаном синтез калози зменшувався втричі (табл.).

Оскільки наявність Ca^{2+} в зовнішньоклітинному середовищі виявилась необхідною для індукції еліситорами обох реакцій — синтезу ФА та накопичення калози, було висунуто припущення, що в процесі індукції захисних реакцій іони Ca^{2+} надходять всередину клітини через кальцієві канали плазматичної мембрани. Тому в подальших експериментах аналізували ефекти речовин, які впливають на концентрацію внутрішньоклітинного кальцію.

Таблиця

Вплив антагоністів Ca^{2+} на індукований еліситорами (Е) синтез ФА та калози в суспензійній культурі клітин цибулі.

Реагент	Концентрація	ФА*		Калоза*	
		−Е	+Е	−Е	+Е
ЕГТА	5 мМ	<1	39	31	52
Верапаміл	0.1 мМ	7	33	36	84
$LaCl_3$	0.1 мМ	13	26	—	—
$CoCl_2$	0.1 мМ	11	67	—	—
ТМВ-8	0.2 мМ	8	43	39	89
Верапаміл + ТМВ-8	0.1 мМ+0.2 мМ	7	<1	37	<1

"—"-не тестували

* Дані наведені як відсоток кількості відповідних речовин, які накопичуються в контрольній суспензії, обробленій лише еліситорами

Вплив агоністів та антагоністів Ca^{2+} на індукцію захисних реакцій

Досліджували дію блокаторів Ca^{2+} каналів на індукцію синтезу ФА та калози. Верапаміл є блокатором потенціал-залежних Ca^{2+} каналів в клітинах тварин (Erdreich , Rahamimoff, 1987). Нещодавно показана його інгібіторна дія на ряд Ca^{2+}-залежних процесів у рослин (Marme, 1989).

Виявилось, що обробка верапамілом (100 мкМ) суспензійної культури клітин *A. cepa* інгібує індукований еліситорами синтез ФА в 6 разів, а калози — в 1.5 рази порівняно з контролем (культурою, обробленою лише еліситорами) (див. табл.). Тобто, в результаті зв'язування еліситора з гіпотетичним рецептором плазматичної мембрани в клітинах цибулі можуть активуватися потенціал-залежні Ca^{2+} канали.

Для з'ясування того, чи потрапляє Ca^{2+} до цитоплазми лише через потенціал-залежні канали, досліджували дію інших блокаторів Ca^{2+} каналів. Відомо, що іони La^{3+} та Co^{2+} в клітинах тварин, завдяки конкурентному зв'язуванню, блокують різні види Ca^{2+} каналів: потенціал- та хемо-чутливі — в клітинах тварин (Крышталь, 1985). Іони La^{3+} взаємодіють з багатьма функціями Ca^{2+} в клітинах рослин (Hepler , Wayne, 1985). Обробка клітин іонами La^{3+} показала, що вони більш ефективно інгібують синтез ФА в клітинах *A. cepa*, ніж верапаміл, який є блокатором лише потенціал-залежних Ca^{2+} каналів (див. табл.). Таким чином, внаслідок "розпізнавання" еліситора рослинною клітиною, вірогідно, активуються різні типи кальцієвих каналів, по яких Ca^{2+} може потрапляти всередину клітини.

Для перевірки цього припущення досліджували вплив Ca^{2+} іонофору A23187 на індукований еліситорами синтез ФА та накопичення калози в клітинах цибулі. Відомо, що іонофор діє як переносчик, полегшує надходження іона через плазмалему і внаслідок цього приводить до збільшення концентрації іонів Ca^{2+} в цитоплазмі

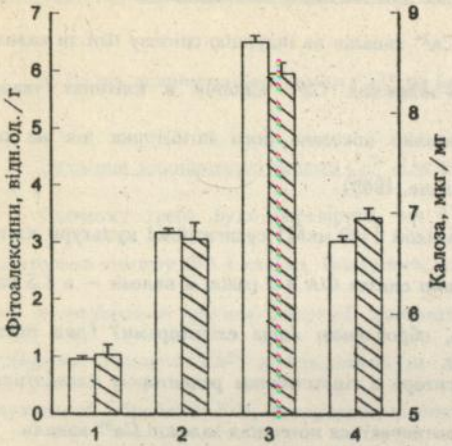


Рис. 2. Синтез ФА та калози суспензією клітин *A. cepa*, оброблених Ca^{2+} іонофором A23187:
1 — контроль;
2 — обробка еліситорами;
3 — іонофор (15 мкМ) + еліситори;
4 — іонофор (15 мкМ) у відсутності еліситорів.
▯ — синтез ФА
▧ — накопичення калози

клітини (Artalejo,Garcia-Sancho, 1988).

Додавання іонофору Ca^{2+} A23187 в інкубаційне середовище викликало помітний стимулюючий ефект на індукцію синтезу ФА та калози (рис. 2). Стимулюючий ефект A23187 по відношенню до обох захисних реакцій зростав із збільшенням концентрації іонофора в середовищі.

Обробка клітин цибулі іонофором A23187 стимулювала синтез ФА та накопичення калози навіть у відсутності еліситорів. В концентрації 15 мкМ A23187 викликав накопичення ФА, яке перевищувало їхній вміст в контролі в 3.5 рази, а калози — в 3 рази. Кількість ФА та калози, індукованих обробкою іонофором, мала такий же порядок величини, що і у клітин, оброблених еліситорами захисних реакцій. Тобто сам іонофор виступає в ролі активного індуктору захисних реакцій. Це дає підстави вважати, що збільшення концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі є своєрідним трігером каскаду захисних реакцій.

Досліджували динаміку індукованого еліситорами потоку Ca^{2+} всередину клітин *A. cepa*. Виявилось, що інгібуючий ефект верапаміла на індукцію обох захисних реакцій залежить від часу його додавання. Так, пригнічення синтезу ФА та

калози відбуваеться лише в тому випадку, коли верапаміл додавали до клітин за 20 хв перед обробкою еліситорами (рис. 3). Якщо верапаміл додавали через 10 хв після обробки еліситорами, він, навпаки, стимулював синтез ФА та калози.

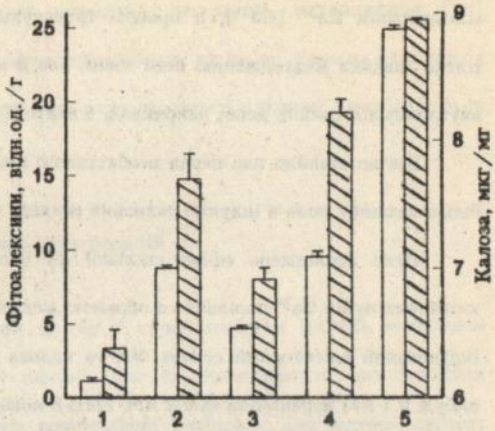


Рис. 3. Дія верапамілу(100 мкМ) на індукований синтез ФА та калози в суспензії клітин *A. cepa* в залежності від часу його додавання:
1 — контроль;
2 — обробка еліситорами;
3 — додавання верапаміла за 20 хв перед еліситорами;
4 — додавання верапамілу одночасно з еліситорами;
5 — додавання верапамілу через 10 хв після еліситорів.
▯ — Синтез ФА,
▨ — Накопичення калози.

Оскільки верапаміл інгібує синтез ФА та калози тільки при додаванні його до культури до обробки еліситором, можна вважати, що Ca^{2+} бере участь на початкових етапах індукції захисних реакцій.

Роль внутрішньо- та зовнішньоклітинних пулів Ca^{2+} в індукції захисних реакцій

(8-N,N-діетиламіно)-октил-3,4,5-триметоксібензоат (ТМВ-8) є блокатором внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} (Kojima et al., 1986). Додавання ТМВ-8 (0.2 мМ) до культури клітин цибулі перед обробкою еліситорами викликало зменшення синтезу ФА в 6 разів, а калози в 2 рази порівняно з культурою, обробленою лише еліситорами (див. табл.). Одержані дані про інгібування ТМВ-8 індукції захисних реакцій в клітинах суспензійної культури *A. cepa* свідчать, що внутрішньоклітинна

концентрація Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i$ в процесі трансдукції сигнала може збільшуватись не тільки завдяки надходженню його зовні, але й в результаті виходу в цитоплазму із внутрішньоклітинних депо, наприклад, з вакуолі.

Все це ставило нас перед необхідністю визначити, який із пулів Ca^{2+} відіграє більш важливу роль в індукції захисних реакцій у *A. cepa*.

Було досліджено ефект спільної дії блокаторів зовнішньо- та внутрішньоклітинних пулів Ca^{2+} порівняно з окремою дією кожного з блокаторів. Виявилось, що індукований еліситорами синтез ФА та калози внаслідок обробки суспензії клітин цибулі 0.1 мМ верапаміла та 0.2 мМ ТМВ-8 повністю пригнічується (див. табл.).

Оскільки інгібуючий ефект від обробки верапамілом та ТМВ-8 є сінергічним, можна припустити, що у випадку блокування одного з Ca^{2+} депо підвищений рівень $[Ca^{2+}]_i$ після обробки еліситором може підтримуватися за рахунок надходження Ca^{2+} з іншого, доступного депо.

Проте внутрішньо- та зовнішньоклітинний пули Ca^{2+} відіграють, мабуть, різну роль в індукції захисних реакцій рослинних клітин. Про що свідчить інгібування синтезу ФА та калози в безкальцієвому середовищі (в присутності 5 мМ ЕГТА). За цих умов внутрішньоклітинний пул Ca^{2+} залишається доступним, проте внаслідок видалення зовнішнього кальцію захисні реакції не індукуються.

Тому можна вважати, що первинним етапом в трансдукції еліситорного сигналу для індукції синтезу ФА та калози в суспензійній культурі клітин *A. cepa* є збільшення вмісту цитоплазматичного Ca^{2+} за рахунок надходження його зовні через канали плазматичної мембрани. В процесі подальшої трансдукції сигналу, можливо, має місце вивільнення Ca^{2+} в цитоплазму і з внутрішньоклітинних депо.

Важливим було з'ясувати, які механізми регулюють надходження Ca^{2+} всередину клітини через канали плазматичної мембрани після зв'язування еліситора з гіпотетичним рецептором плазматичної мембрани рослинної клітини. Тому далі була досліджена

4. Участь цАМФ в індукції захисних реакцій

Обробка суспензійної культури клітин *A. cepa* агоністом цАМФ теофіліном викликала індукцію синтезу ФА і калози (рис. 4). Інтенсивність цих захисних реакцій відрізнялась в залежності від концентрації теофіліна: для індукції синтезу ФА оптимальною була концентрація теофіліна 0.05 мМ, для індукції накопичення калози оптимальною виявилась концентрація теофіліна 0.5 мМ. Одержані дані свідчать, що підвищення рівня цАМФ в клітині може стимулювати синтез ФА та калози.

Для перевірки цього припущення досліджували вплив дибутирил цАМФ (дБцАМФ) на індукцію синтезу ФА та калози в суспензійній культурі клітин цибулі. ДБцАМФ, як відомо, є проникним через плазматичну

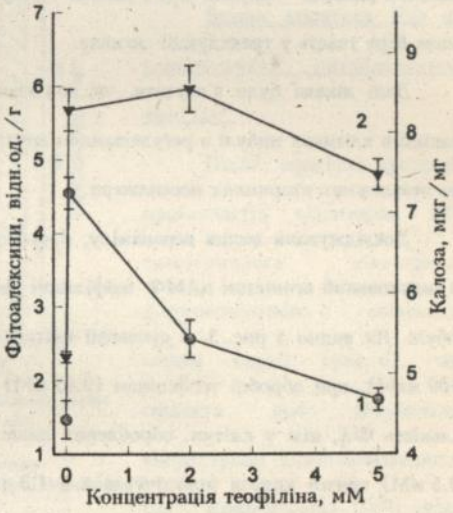


Рис. 4 Ефект теофіліна на індукцію синтезу ФА і калози в суспензії клітин *A. cepa*.
1 — синтез ФА;
2 — накопичення калози

мембрану аналогом цАМФ, стійким до дії окислювачів, і оброблені ним клітини мають підвищений вміст цАМФ в цитоплазмі (Kurosaki et al., 1989). Виявилось, що додавання дБцАМФ (0.01 мМ) до суспензії клітин, обробленої еліситорами, приводить до збільшення синтезу ФА в 4 рази, а калози в 1.7 рази порівняно з контролем, обробленим лише еліситорами. Стимулююча активність зростала із збільшенням концентрації дБцАМФ, який стимулював синтез ФА в суспензії клітин *A. cepa* і без еліситорів. В концентрації 0.1 мМ дБцАМФ мав приблизно такий же ФА-індукуючий ефект в суспензійній культурі, як і біогенний еліситор з *B. cinerea* (КФ).

Одержані експериментальні дані дають можливість зробити висновок про те, що підвищення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ приводить до індукції двох захисних реакцій – синтеза ФА і калози – в культурі клітин *A. cepa*. Тобто, цАМФ також бере участь у трансдукції сигналу.

Далі цікаво було з'ясувати, чи пов'язана дія цАМФ на індукцію захисних реакцій в клітинах цибулі з регулюванням внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+}, чи це є два незалежних вторинних месенджери.

Досліджували вплив верапамілу, блокатора потенціал-залежних Ca^{2+}-каналів, на індукований агоністом цАМФ теофіліном синтез ФА та калози в культурі клітин цибулі. Як видно з рис. 5, в суспензії клітин, преінкубованих 30 хв з верапамілом (100 мкМ), при обробці теофіліном (0.05 мМ) накопичувалась майже вдвічі менша кількість ФА, ніж у клітин, оброблених лише теофіліном. Індукований теофіліном (0.5 мМ) синтез калози пригнічувався в 1.3 рази внаслідок преінкубації суспензії клітин з верапамілом.

Таким чином, можна стверджувати, що саме цАМФ-залежна активація Ca^{2+}-

струму всередину клітини лежить в основі індукції захисних реакцій в клітинах *A. cepa*.

5. Зміни внутрішньоклітинного Ca^{2+} в процесі індукції захисних реакцій у *A. cepa*

Для підтвердження одержаних нами даних про участь цАМФ-залежного короткочасного кальцієвого струму в індукції захисних реакцій, необхідно було дослідити вплив еліситорів захисних реакцій на $[Ca^{2+}]_i$. Для цього ми дослідили зміни $[Ca^{2+}]_i$ при індукції захисних реакцій за допомогою Ca^{2+}-чутливого флуоресцентного зонду індо-1.

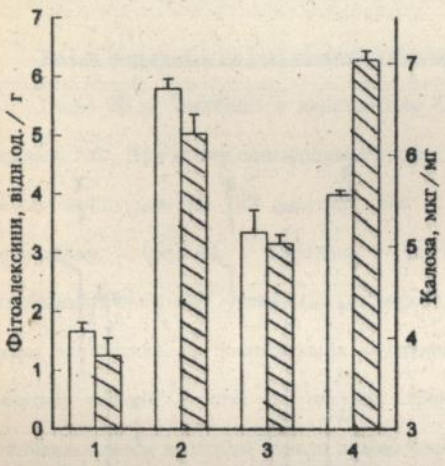


Рис. 5 Вплив верапаміла на індукований теофіліном синтез ФА та калози в суспензії клітин *A. cepa*:
1 — контроль;
2 — обробка оптимальною концентрацією теофіліну;
3 — додавання 100 мкМ верапаміла за 30 хв перед обробкою теофіліном;
4 — додавання верапаміла через 10 хв після обробки теофіліном.
▯ — синтез ФА
▨ — накопичення калози

<u>Вплив еліситора КФ на концентрацію цитоплазматичного Ca^{2+}</u>

Після обробки суспензії протопластів еліситором КФ спостерігалось підвищення флуоресцентного співвідношення індо-1 (рис. 6), що свідчить про збільшення концентрації цитоплазматичного Ca^{2+}. Концентрація $Ca^{2+}{}_i$ через

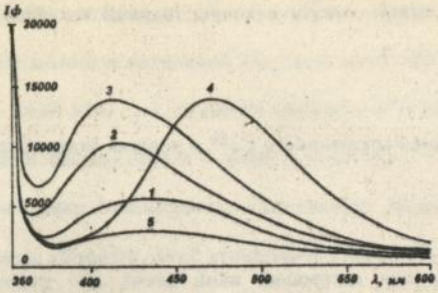


Рис. 6 Вплив еліситора КФ на спектральні характеристики протопластів *A. cepa*, навантажених індо-1:
1 — спектр флуоресценції інтактних протопластів;
2,3,4,5 — спектри флуоресценції протопластів після послідовного додавання до інкубаційного середовища
10 мкл/мл еліситора КФ (2), 10 мкМ дигітоніна (3), 3 мМ ЕГТА (4) та 20 мМ $MnCl_2$ (5). Концентрація Ca^{2+} в інкубаційному середовищі 1 мМ.

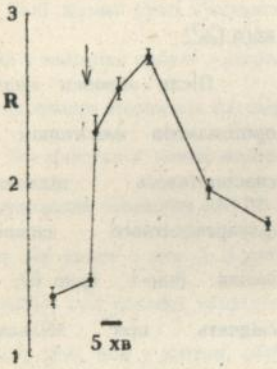


Рис. 7 Динаміка змін флуоресцентного співвідношення індо-1 (R) в протопластах *A. cepa*, оброблених еліситором КФ (10 мкл/мл). Стрілкою позначене додавання еліситора.

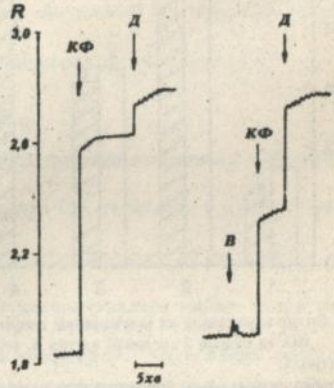


Рис. 8 Вплив верапаміла на індуковані еліситором КФ зміни флуоресцентного співвідношення індо-1 (R) в протопластах *A. cepa*.
Стрілками позначено додавання 50 мкМ верапаміла (В), 10 мкл/мл еліситора (КФ) та 10 мкМ дигітоніна (Д).

10–15 сек після додавання КФ зростала від 220 нМ до 370 нМ.

Підвищення $[Ca^{2+}]_i$ мало короткочасний характер (рис. 7). Флуоресцентне співвідношення індо-1 досягало максимального значення через 5–7 хв після додавання КФ і поступово спадало. Через 30 хв після обробки КФ флуоресцентне співвідношення встановлювалось на стаціонарному рівні, який відповідав на 20–30 нМ вищій концентрації цитоплазматичного Ca^{2+}, ніж перед додаванням КФ. Такий стаціонарний рівень $[Ca^{2+}]_i$ зберігався в суспензії протопластів протягом як мінімум 1.5 год. Для з'ясування того, зовнішньо- чи внутрішньоклітинний пул в клітинах цибулі є джерелом підвищення $[Ca^{2+}]_i$ після обробки еліситором, ми досліджували

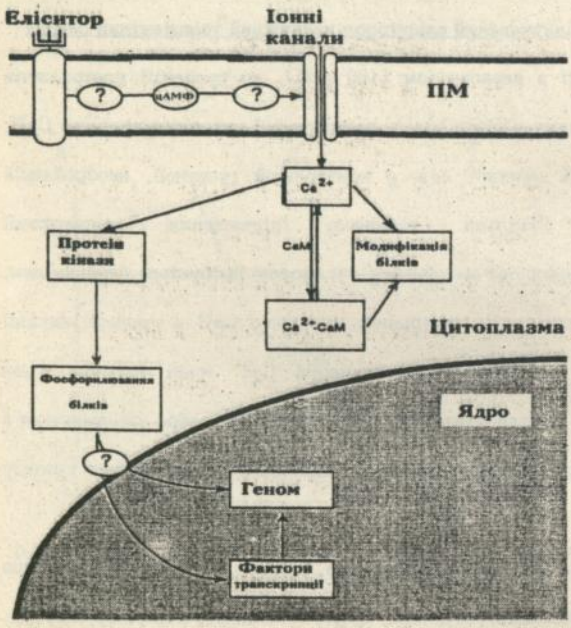
Вплив верапаміла на індукований еліситором кальцієвий транзієнтний сигнал

Після 30 хв інкубації з верапамілом (100 мкМ), до суспензії протопластів додавали КФ. При цьому спостерігався сплеск концентрації цитоплазматичного Ca^{2+}, але за амплітудою на 70% менший, ніж в контрольній суспензії, необробленій верапамілом (рис. 8). Оскільки тимчасове підвищення концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} у відповідь на обробку еліситором інгібується верапамілом, можна припустити, що концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} в процесі індукції захисних реакцій зростає за рахунок проникнення Ca^{2+} зовні клітини через потенціал-залежні кальцієві канали плазматичної мембрани. Це добре узгоджується з одержаними нами раніше даними про інгібування верапамілом індукованого синтезу ФА в суспензійній культурі клітин *A. cepa*.

Таким чином, результати експериментів по безпосередньому вимірюванню концентрації вільного цитоплазматичного Ca^{2+} дають можливість стверджувати, що:

1) в результаті обробки грибним еліситором концентрація Ca^{2+} в рослинних клітинах підвищується; 2) підвищення $[Ca^{2+}]_i$ носить короткочасний характер; 3) рівень Ca^{2+} в цитозолі зростає внаслідок проникнення його зовні через кальцієві канали плазматичної мембрани.

На базі проведеної роботи ми визнали за можливе запропонувати такий механізм індукції захисних реакцій (рис. 9). Зв'язування еліситора з гіпотетичним рецептором на плазматичній мембрані приводить до активації в клітині ферментів синтезу цАМФ. Підвищення концентрації цАМФ активує Ca^{2+}-канали плазмалеми, через які Ca^{2+} поступає всередину клітини. Іншим джерелом підвищення концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} можуть бути внутрішньоклітинні депо Ca^{2+}, зокрема, вакуоль.



Іони Ca^{2+} можуть безпосередньо активувати ферменти синтезу захисних речовин (наприклад, калозосинтетазу), або, утворюючи комплекси з кальмодулінами, активувати протеїнкінази, які в свою чергу активують ферменти, відповідальні за синтез ФА.

Рис. 9. Гіпотетична схема трансдукції еліситорних сигналів в клітинах *Allium cepa*

ВИСНОВКИ

1. Одержано калусну та суспензійну культури клітин *Allium cepa*. Підібрані оптимальні умови для дослідження індукції захисних реакцій в суспензії клітин цибулі.

2. Встановлено, що Ca^{2+} виконує роль вторинного месенджера в індукції захисних реакцій в клітинах *Allium cepa*.

3. Показано, що ряд речовин, які модифікують концентрацію цитоплазматичного Ca^{2+}, змінюють інтенсивність синтезу ФА та калози в суспензійній культурі клітин *Allium cepa*.

4. За допомогою кальційчутливого флуоресцентного зонду індо-1 продемонстровано, що внаслідок обробки еліситорами захисних реакцій в клітинах цибулі тимчасово підвищується концентрація цитоплазматичного Ca^{2+} в основному завдяки проникненню його зовні через канали плазматичної мембрани, та в меншій мірі — за рахунок виходу Ca^{2} з внутрішньоклітинних депо.

5. Встановлено, що цАМФ бере участь в індукції захисних реакцій, можливо, регулюючи надходження Ca^{2+} в клітини через канали плазматичної мембрани.

6. На базі проведеної роботи запропонований механізм індукції захисних реакцій в клітинах *A. cepa*.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Dmitriev A.P., Perkovskaya G.Y., Dyachok J.V. Activation of defence – related genes in onion //3 Intern. Congr. Mol. Biology. Abstracts. USA, Tucson. 1991. P.1314

2. Дячок Ю.В., Гуща Н.И., Ковтун А.В., Дмитриев А.П. Культура клеток *Allium cepa* как объект исследования иммунных реакций растений // II Российский симпозиум "Новые методы биотехнологии растений". Тезисы. Пущино. 1993 г. С.137.

3. Дячок Ю.В., Гуща Н.И., Ковтун А.В., Дмитриев А.П. Синтез фитоалексинов лука культурой клеток *Allium cepa in vitro* // Физиол. биохим. культ. растений. 1994. N4. С.399-405.

4. J.V.Dyachok, A.P. Dmitriev. Pathogen – elicited phytoalexin synthesis in *Allium cepa* cell culture depends from calcium. // VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Abstracts. Italy, Firenze. 1994. P.222.

5. Dyachok J.V., Dmitiev A.P. Calcium involvment in elicitation of phytoalexin synthesis in *Allium cepa* cell culture // Cell Biol. Intern. 1994. V.18, N5, P.405.

6. Dmitriev A.P., Dyachok J.V. Defence reactions and signal transduction in onion (*Allium cepa*) cells // International Symposium "Plant Biotechnology and Genetic Engineering". Abstracts. Kiev. 1994.

7. Дячок Ю.В., Дмитриев А.П. Регуляция синтеза фитоалексинов в культуре клеток *Allium cepa in vitro* // III Международный симпозиум "Новые методы биотехнологии растений". Тезисы. Пущино. 1995 г.

8. Дячок Ю.В., Дмитрієв О.П., Гродзинський Д.М. Трансдукція сигналу для синтезу фітоалексинів в культурі клітин *Allium cepa in vitro*. // Доповіді НАН України. 1995. N4. С.101–103.

Дячок Ю.В. Роль Ca^{2+} как вторичного мессенджера в индукции защитных реакций в культуре клеток *Allium cepa* L.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25 – клеточная биология, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 8 научных работ, которые содержат исследования роли Ca^{2+} в индукции защитных реакций в суспензионной культуре клеток *Allium cepa* L. Установлено, что Ca^{2+} выполняет функции вторичного мессенджера в индукции синтеза фитоалексинов и накопления каллозы. С помощью Ca^{2+} – чувствительного флуоресцентного зонда индо-1 показано, что в обработанных биогенным элиситором из фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* протопластах *Allium cepa* происходит кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме за счет проникновения его извне через каналы плазматической мембраны.

Dyachok J.V. Role of Ca^{2+} as a second messenger in elicitation of defence reactions in *Allium cepa* suspension cell culture.

Thesis for obtaining scientific degree of Candidate of Biological Sciences on speciality 03.00.25 – Cell Biology, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1995.

8 published papers to be defended contain investigation on role of Ca^{2+} in induction of defence reactions in *Allium cepa* suspension cell culture. Ca^{2+} has been established to be a second messenger in elicitation of phytoalexin synthesis and callose accumulation. Measurements of intracellular calcium concentration with fluorescent probe indo-1 shown that apparent transient calcium signal occurs in onion protoplasts treated with biotic elicitor derived from *Botrytis cinerea*.

ПІдписано до друку II.09.95р. Формат 60х84/I6
ПапІр друк.Умов.друк.л.I,0. Тираж IOO примІрник.Заказ № I385

Надруковано ЦУОП ДНПП "Плодвинконсерв" м.КиІв,Саксаганского,I.