

Оригинальные работы

УДК 577.125.53

И.В. ПОКОТИЛО, С.В. КРЕТИНИН, В.С. КРАВЕЦ

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев

E-mail: Pokotylo@bpci.kiev.ua

РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗЫ D В РЕАКЦИЯХ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА *сах1* НА ДЕЙСТВИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА



*Исследования направлены на выявление первичных реакций метаболизма клеток растений при действии солевого стресса. Обнаружена активация регуляторного фермента фосфолипазы D у растений табака дикого типа, а также у трансгенных растений табака *сах1* на ранних этапах действия солевого стресса. Установлено, что нарушение внутриклеточного гомеостаза ионов кальция, а также угнетение активности фосфолипазы D снижают стойкость растений табака к воздействию засоления и указывают на вовлечение упомянутых систем в сигналинг при стресс-адаптации растений.*

© И.В. ПОКОТИЛО, С.В. КРЕТИНИН, В.С. КРАВЕЦ, 2012

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2012. № 3

Введение. Распространенность и степень неблагоприятного влияния солевого стресса обуславливают его позиционирование в качестве одного из ключевых лимитирующих факторов роста. У большинства растений чувствительность к его воздействию сохраняется на протяжении всего онтогенеза и способствует существенному угнетению метаболических процессов. Однако растительные организмы способны непосредственно реагировать на изменение условий среды и инициировать на биохимическом уровне активацию компенсаторных механизмов [1, 2].

Среди рассматриваемых посредников рецепции стрессовых сигналов одно из ведущих мест занимают фосфолипазы – ферменты, способные обеспечивать продукцию сигнальных молекул при гидролизе полярных фосфолипидов мембран [3]. Ряд изоформ фосфолипаз D (ФЛД) растений характеризуются локализацией на плазмалемме [4], на уровне которой опосредуется первичный контакт биологических процессов цитозоля с изменчивой внешней средой. Предполагается, что взаимодействие белков с рецепторными свойствами, активаторных G-белков и фосфолипаз может являться одним из механизмов, способных обеспечить инициирование трансдукции сигналов и активацию защитных реакций у растений в ответ на действие стрессовых факторов [5, 6]. В подтверждение этому было показано, что активация ФЛД и возрастание продукции фосфатидной кислоты и ряда других вторичных мессенджеров липидной природы наблюдается на ранних этапах действия ряда абиотических [7] и биотических стрессов [8], а также в ответ на действие гормонов [9].

Вместе с тем ионы кальция в клетках растений также известны как важные сигнальные агенты, а особенности их внутриклеточной компартментализации и концентрационных градиентов непосредственно модулируют протекание ряда метаболических процессов при нормальных условиях роста и при воздействии стрессовых факторов [10, 11]. Установлено, что многие регуляторные ферменты клеток растений являются Ca^{2+} -зависимыми, включая большинство изоформ растительных ФЛД, содержащих C2-домен [12], а также белок SOS3 [13] – компонент ключевой клеточной адаптационной системы salt-overly-

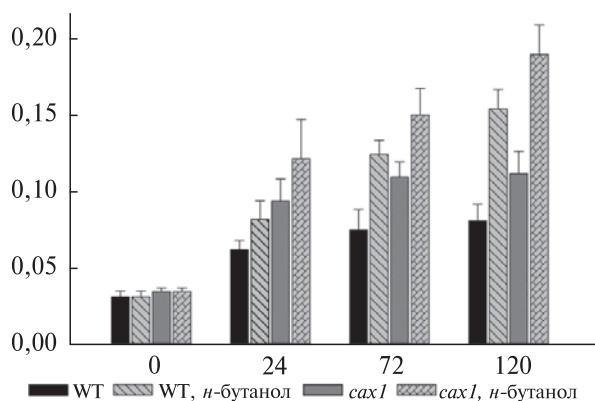


Рис. 1. Накопление МДА в тканях листьев табака при действии солевого стресса: по вертикали – концентрация МДА, мкмоль/мг сырого веса; по горизонтали – действие солевого стресса, сут

sensitive (SOS) растений, которая активируется при действии солевого стресса и обеспечивает контроль поступления токсических ионов Na^{2+} в цитозоль [2]. Интересно отметить, что фосфатидная кислота, являясь продуктом ФЛД, способствует активации вакуолярного Na^+/H^+ антипортера SOS1 – эффекторного компонента системы SOS [14], что может указывать на интеграцию сигнальных систем клеток растений при стресс-сигналинге.

Таким образом, предполагаемое регуляторное взаимодействие растительных фосфолипазных ферментов и ионов Ca^{2+} , а также их непосредственное участие в клеточной регуляции на сегодня представляется важным механизмом развития защитного ответа в стрессовых условиях. В настоящей работе при использовании модели трансгенных растений проанализированы особенности вовлечения ФЛД и внутриклеточных транспортеров ионов Ca^{2+} в регуляцию метаболизма в условиях воздействия солевого стресса и их роль в развитии адаптивных реакций растений.

Материалы и методы. В работе использованы растения табака *Nicotiana tabacum* KY-160, а также трансгенные растения табака *sax1*, экспрессирующие кодирующую область гена $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ вакуолярного антипортера Арабидопсиса *sax1* (Cation Exchanger 1, At2g38170) с применением промотора вируса мозаики цветной капусты [15].

Активность ФЛД *in vivo* определяли по реакции трансфосфатидирования P^{33} меченых

липидов из высечек листьев табака в присутствии 0,8%-ного *n*-бутанола в среде инкубации [9] в ответ на кратковременное действие солевого стресса в форме 50 мМ NaCl. Фосфолипиды разделяли на силикагелевых пластинах для тонкослойной хроматографии в органической фазе системы этилацетат : изооктан : муравьиная кислота : вода (12:2:3:10 об./об.). В целях идентификации продуктов использовали вещества-стандарты («Sigma», США). Меченые фосфолипиды визуализировали методом автордиографии на рентгеновской пленке. Количественную активность образцов фосфолипидов определяли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике LKB-Wallac Rack-Beta 1219.

Для оценки уровня адаптированности растений табака к действию солевого стресса, моделируемого в среде Хогланда–Арнона воздействием 200 мМ соли NaCl, в тканях листьев определяли содержание малонового диальдегида (МДА) и активность ферментов антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Об интенсивности перекисного окисления липидов судили по уровню МДА в соответствии с методикой [16]. Абсорбцию супернатанта измеряли при 532 нм, используя при расчете концентрации коэффициент миллимолярной экстинкции МДА $155/\text{мМ}\cdot\text{см}^{-1}$. Активность супероксиддисмутазы определяли путем анализа снижения интенсивности фотохимического восстановления нитросинего тетразолия [17].

Активность каталазы определяли по снижению количества окрашенного комплекса молибдата аммония, вступающего в реакцию с пероксидом водорода, при использовании коэффициента миллимолярной экстинкции H_2O_2 $22,2\cdot 10^{-3} \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [18].

Удельную активность ферментов определяли с помощью анализа содержания растворимых белков в исследуемых экстрактах по методу Бредфорд [19] и выражали в единицах активности фермента (мкмоль/мин·л)/мг белка.

Результаты исследования и их обсуждение. Растения табака относятся к гликофитным организмам, чувствительным к воздействию засоленности, и широко используются в качестве объектов исследования негативного стресс-

сового влияния и возможностей его компенсации биотехнологическими методами. Воздействие солевого стресса вызывало повышение концентрации малонового диальдегида (МДА) в тканях листьев табака, и его содержание более чем в два раза превысило физиологический уровень вслед за суточным пребыванием растений в ростовой среде, содержащей 200 мМ NaCl (рис. 1). Известно, что МДА является маркером деградации полиненасыщенных липидов, а его накопление свидетельствует о повреждении клеточных мембран и развитии состояния оксидативного стресса. Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать о стремительном угнетении метаболизма растений табака в условиях засоленности и указывают на необходимость быстрой индукции защитных реакций организма при действии стрессора.

В связи с этим нами установлена существенная активация фосфолипазы D *in vivo* у растений табака на ранних этапах действия солевого стресса (рис. 2), что ранее было показано для растений арабидопсиса [20] и риса [21]. Возрастание продукции фосфатидилбутанола в результате реакции трансфосфатидилирования, которая является показателем активации ФЛД, наблюдали уже через 10 мин воздействия 50 мМ соли NaCl. Это может указывать на непосредственное вовлечение ФЛД, а также фосфатидной кислоты в качестве липофильного вторичного мессенджера, в инициацию сигналинга, направленного на активацию компенсаторных реакций в условиях засоленности.

С целью исследования особенностей реализации защитных реакций растений в стрессовых условиях в настоящей работе использовали трансгенные растения табака *sax1*, характеризующиеся гиперэкспрессией гена *SAX1* арабидопсиса. *SAX1* антипортеры обеспечивают низкоаффинный транспорт цитозольных ионов Ca^{2+} в вакуоль — компартмент аккумулирующий ионы Ca^{2+} в зрелых клетках растений [22].

Ранее было установлено, что трансгенные растения табака *sax1* характеризуются истощением цитозольного пула ионов Ca^{2+} (что обуславливает нарушение их общего клеточного гомеостаза и функций сигналинга), а

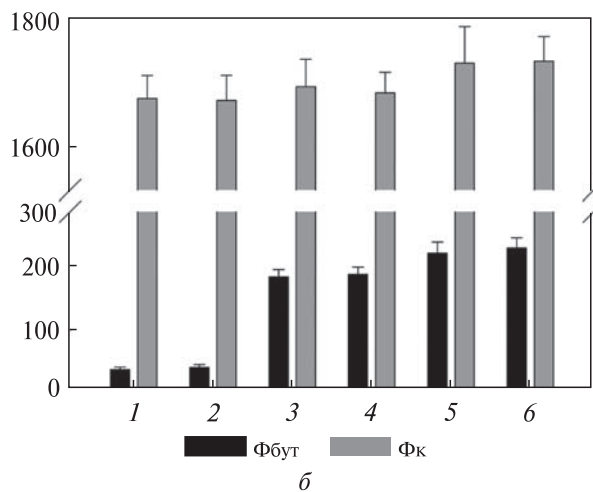
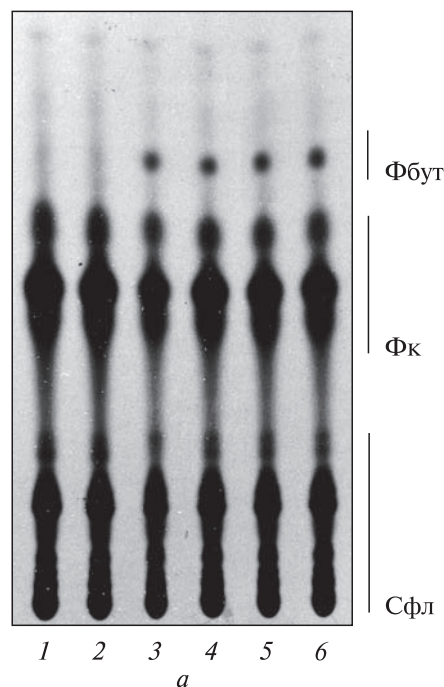


Рис. 2. Активация фосфолипазы D при действии солевого стресса: а — автордиограмма хроматограммы P^{33} меченых липидов растений табака; б — сцинтилляционный счет зон фосфатидилбутанола и фосфатидной кислоты автордиограммы: по вертикали — количество радиомеченных продуктов, распадов в 1 мин; по горизонтали — 1 — растения дикого типа, контроль; 2 — растения *sax1*, контроль; 3 — растения дикого типа, солевой стресс, 10 мин; 4 — растения *sax1*, солевой стресс, 10 мин; 5 — растения дикого типа, солевой стресс, 20 мин; 6 — растения *sax1*, солевой стресс, 20 мин; Фбут — фосфатидилбутанол, Фк — фосфатидная кислота, Сфл — структурные фосфолипиды

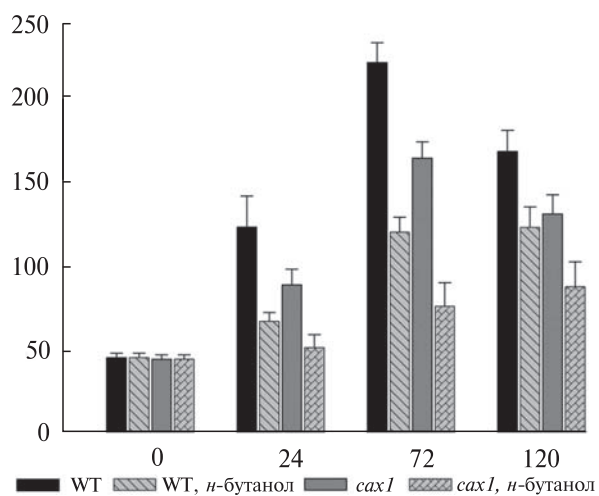


Рис. 3. Активация СОД в тканях листьев табака при действии солевого стресса: по вертикали – активность СОД, ед. акт./мг белка; по горизонтали – действие солевого стресса, сут

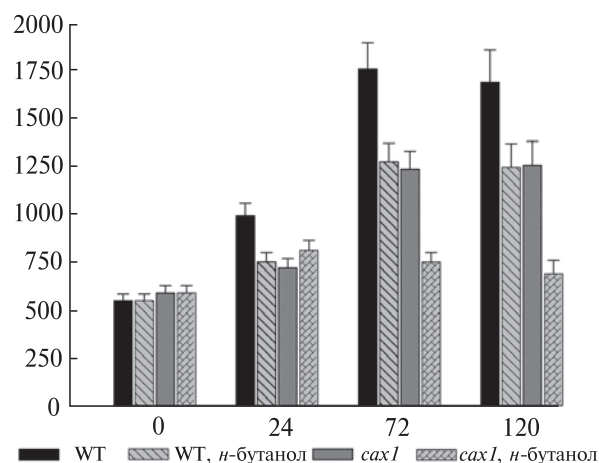


Рис. 4. Активация каталазы в тканях листьев табака при действии солевого стресса: по вертикали – активность каталазы, ед. акт./мг белка; по горизонтали – действие солевого стресса, сут

также повышенной чувствительностью к действию холодового шока [15]. Экспрессия гена *SAX1* арабидопсиса вызывала нарушения компартиментализации ионов Ca^{2+} у томатов [23], а у галофитного растения *Suaeda salsa* продемонстрировано вовлечение антипортера *SsCAX1* в регуляцию Ca^{2+} -сигналинга при действии солевого стресса [24]. В результате проведенных исследований нами обнаружено, что у трансгенных растений табака *sax1*

при действии солевого стресса также наблюдается активация ФЛД (рис. 2). Несмотря на то, что ФЛД растений известны в качестве Ca^{2+} -зависимых ферментов [12], активация ФЛД в стрессовых условиях, очевидно, способна проходить в условиях дефицита уровня цитозольных ионов Ca^{2+} . Это может свидетельствовать о наличии внутриклеточных механизмов локального поддержания концентрации ионов кальция в микродоменах мембран и липидных рафтах, необходимой для инициации сигналинга при изменении условий среды. Полученные результаты могут указывать на возможность превалирующего участия кальций-независимых изоформ ФЛД [25] в процессах трансдукции сигналов, индуцируемых при действии солевого стресса, а также изоформ ФЛД β и γ , которые способны проявлять активность в присутствии микромолярных концентраций ионов Ca^{2+} .

Анализ трансгенных растений табака *sax1* позволил установить, что нарушение метаболизма и функций сигналинга ионов Ca^{2+} у изученных растений обуславливает снижение их общей стойкости к воздействию засолённости. Растения *sax1* после 120 ч воздействия солевого стресса в форме 200 мМ NaCl характеризовались повышенным содержанием МДА (более чем на 25 %) в тканях по сравнению с растениями дикого типа в идентичных условиях (рис. 1). Оценку уровня адаптации растений и степени негативного влияния солевого стресса осуществляли путем определения активности клеточных антиоксидантных ферментов. Известно, что рост растений в условиях засолённости вызывает угнетение фотосинтеза и чрезмерное восстановление электрон-транспортной цепи в хлоропластах и митохондриях. Это способствует многократному повышению продукции активных форм кислорода (АФК). Результирующее накопление АФК в клетках растений способно вызывать токсические эффекты, включающие перекисное окисление липидов и окислительное повреждение ДНК и белков. Способность клеток эффективно подавлять избыточное накопление АФК в условиях воздействия солевого стресса является одним из определяющих факторов адаптации растительного организма [26]. Более того, индукция актив-

ности антиоксидантных ферментов рассматривается в качестве перспективного метода увеличения стойкости растений к действию стрессов [27]. В результате проведенных исследований установлено, что в условиях воздействия солевого стресса у растений табака происходит активация ферментов антиоксидантной защиты, включающих супероксиддисмутазу (рис. 3) и каталазу (рис. 4). В то же время трансгенные растения *cax1* характеризовались существенным относительным снижением активности каталазы после 120 ч действия солевого стресса в сравнении с растениями дикого типа. Относительное снижение активности супероксиддисмутазы у трансгенных растений *cax1* было менее выраженным и составляло около 15 % после 72 ч действия стрессора. Полученные экспериментальные данные могут указывать на важность поддержания физиологически значимого уровня ионов Ca^{2+} в цитозоле и вероятное вовлечение кальциевого сигналинга в формирование защитных реакций метаболизма в условиях засоленности.

Применение ингибитора активности ФЛД *n*-бутанола [28] в настоящем исследовании позволило установить роль фосфолипазных ферментов в развитии защитных реакций растительного организма при стрессовых условиях. Установлено, что воздействие 50 мМ *n*-бутанола приводило к повышению концентрации МДА в листьях растений табака при действии солевого стресса (рис. 1). Угнетение активности ФЛД также обуславливало относительное снижение активности супероксиддисмутазы в тканях листьев табака дикого типа на 30 % (рис. 3). Кроме того, относительное снижение активности каталазы было более существенным и составляло около 60 % ее активности у контрольных растений (рис. 4). Исходя из полученных результатов можно предположить, что регуляторный фермент ФЛД, а также липидные мессенджеры, продукцию которых она обеспечивает, участвуют в развитии защитных реакций организма, обеспечивающих активацию ферментов антиоксидантной защиты, а угнетение функций ФЛД обуславливает повышение чувствительности растений к солевому стрессу.

Кроме того, удалось выяснить, что ингибирование активности ФЛД у трансгенных растений *cax1* обуславливает аддитивное угнетение адаптивных реакций организма в условиях воздействия солевого стресса и приводит к повышению содержания МДА в тканях листьев более чем в два раза по сравнению с растениями дикого типа (рис. 1). Показано, что растения табака *cax1* при действии *n*-бутанола дополнительно характеризовались существенным снижением показателей активности антиоксидантных ферментов каталазы (рис. 4) и СОД (рис. 3), что свидетельствует о неспособности растений табака к активации защитных реакций метаболизма в условиях афункциональности клеточных сигнальных систем, вовлекающих ФЛД и ионы Ca^{2+} .

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что у растений табака дикого типа, а также у трансгенных растений табака *cax1* на ранних этапах действия солевого стресса наблюдается активация фосфолипазы D. Кроме того, экспериментальные данные свидетельствуют о вероятном дискретном вовлечении как фосфолипазы D, так и ионов Ca^{2+} в процессы адаптации метаболизма растений табака при действии солевого стресса.

*Выражаем благодарность профессору К. Хирши за предоставленные семена растений табака *cax1*. Работа выполнена при поддержке НАН Украины 2.1.10.32–10. и ЦНП 9.1-07.*

*I.V. Pokotylo,
S.V. Kretinin, V.S. Kravets*

ROLE OF PHOSPHOLIPASE D IN METABOLISM REACTIONS OF TRANSGENIC TOBACCO *cax1* CELLS UNDER SALINITY STRESS

The work was aimed at investigation of primary reactions of plant cell metabolism in response to salt stress influence. It was found that phospholipase D regulatory enzyme is activated in wild type tobacco plants and transgenic *cax1* tobacco plants during the early stages of salt stress influence. We have shown that disturbance of intracellular calcium ions homeostasis and oppression of phospholipase D activity decrease resistance of tobacco plants under salinity influence and also indicate the implication of such systems to signaling during stress adaptation of plants.

И.В. Покотило, С.В. Кретинин, В.С. Кравець
 РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗИ D В РЕАКЦИЯХ
 МЕТАБОЛИЗМУ КЛІТИН ТРАНСГЕННИХ
 РОСЛИН ТЮТЮНУ *sax1* НА ДІЮ
 СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

Дослідження спрямовані на з'ясування первинних реакцій метаболізму клітин рослин за умов дії сольового стресу. Виявлено активацію регуляторного ферменту фосфоліпази D у рослин тютюну дикої типу, а також у трансгенних рослин тютюну *sax1* на ранніх етапах дії сольового стресу. Показано, що порушення внутрішньоклітинного гомеостазу іонів кальцію, а також пригнічення активності фосфоліпази D знижують стійкість тютюну до дії засоленості та вказують на залучення згаданих систем до сигналіngu за умов стрес-адаптації рослин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radyukina N., Ivanov Y., Kartashov A., Shevyakova N., Rakitin V., Khryanin V., Kuznetsov V. Inducible and constitutive mechanisms of salt stress resistance in *Geum urbanum* L. // Rus. J. Plant Physiol. – 2007. – **54**, № 5. – P. 612–618.
2. Qiu Q.S., Guo Y., Quintero F.J., Pardo J.M., Schumaker K.S., Zhu J.K. Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) pathway // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, № 1. – P. 207–215.
3. Ruy S., Wang X. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves // Biochim. biophys. acta. – 1996. – **1303**. – P. 243–250.
4. Novotná Z., Martinec J., Profotová B., Ždárková Š., Kader J. C., Valentová O. In vitro distribution and characterization of membrane-associated pld and pi-plc in *Brassica napus* // J. Exp. Bot. – 2003. – **54**, № 383. – P. 691–698.
5. Ritchie S., Gilroy S. Abscisic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane // Plant Physiol. – 2000. – **124**, № 2. – P. 693–702.
6. Munnik T., Arisz A., de Vrije T., Musgrave A. G protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants // Plant Cell. – 1995. – **7**. – P. 2197–2210.
7. Li W., Li M., Zhang W., Welti R., Wang X. The plasma membrane-bound phospholipase D[delta] enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Biotech. – 2004. – **22**, № 4. – P. 427–433.
8. Andersson M.X., Kourtchenko O., Dangl J.L., Mackey D., Ellerström M. Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. – 2006. – **47**, № 6. – P. 947–959.
9. Kravets V.S., Kolesnikov Y.S., Kretynin S.V., Getman I.A., Romanov G.A. Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system // Physiol. Plant. – 2010. – **138**, № 3. – P. 249–255.
10. Van der Meulen R., Visser K., Wang M. Effects of modulation of calcium levels and calcium fluxes on ABA-induced gene expression in barley aleurone // Plant Sci. – 1996. – **117**, № 1/2. – P. 75–82.
11. Monshausen G.B., Bibikova T.N., Weisenseel M.H., Gilroy S. Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots // Plant Cell Online. – 2009. – **21**, № 8. – P. 2341–2356.
12. Zheng L., Krishnamoorthi R., Zolkiewski M., Wang X. Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 26. – P. 19700–19706.
13. Lin H., Yang Y., Quan R., Mendoza I., Wu Y., Du W., Zhao S., Schumaker K.S., Pardo J.M., Guo Y. Phosphorylation of SOS3-like calcium binding protein8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2009. – **21**, № 5. – P. 1607–1619.
14. Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana* // New Phytol. – 2010. – **188**, № 3. – P. 762–773.
15. Hirschi K.D. Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco : Altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity // Plant Cell. – 1999. – **11**, № 11. – P. 2113–2122.
16. Madhava Rao K.V., Sresty T.V.S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses // Plant Sci. – 2000. – **157**, № 1. – P. 113–128.
17. Van Rossum M.W.P.C., Alberda M., Van der Plas L.H.W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation // Plant Sci. – 1997. – **130**, № 2. – P. 207–216.
18. Королюк М., Иванов Л., Майорова М., Токарева В. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – **1**. – P. 16–19.
19. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein uti-

- lizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72, № 1/2. — P. 248–254.
20. Bargmann B.O.R., Laxalt A.M., Riet B.T., Van Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M.A., Bartels D., Munnik T. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants // Plant and Cell Physiol. — 2009. — 50, № 1. — P. 78–89.
 21. Darwish E., Testerink C., Khalil M., El-Shihy O., Munnik T. Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves // Plant and Cell Physiol. — 2009. — 50, № 5. — P. 986–997.
 22. Pottosin I.I., Schunknecht G. Vacuolar calcium channels // J. Exp. Bot. — 2007. — 58, № 7. — P. 1559–1569.
 23. Chung M.Y., Han J.S., Giovannoni J., Liu Y., Kim C.K., Lim K.B., Chung J.D. Modest calcium increase in tomatoes expressing a variant of *Arabidopsis* cation/H⁺ antiporter // Plant Biotech. Rep. — 2010. — 4, № 1. — P. 15–21.
 24. Han N., Shao Q., Bao H., Wang B. Cloning and characterization of a Ca²⁺/H⁺ antiporter from halophyte *Suaeda salsa* L. // Plant Mol. Biol. Rep. — 2010. — 29, № 2. — P. 1–9.
 25. Qin C., Wang X. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains // Plant Physiol. — 2002. — 128, № 3. — P. 1057–1068.
 26. El-Shabrawi H., Kumar B., Kaul T., Reddy M.K., Singla-Pareek S.L., Sopory S.K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in *Pokkali rice* // Protoplasma. — 2010. — 245, № 1–4. — P. 1–12.
 27. Joseph B., Jini D. Development of salt stress-tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes // Asian J. Agricult. Res. — 2011. — 5, № 1. — P. 17–27.
 28. Motes C.M., Pechter P., Yoo C.M., Wang Y.S., Chapman K.D., Blancaflor E.B. Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-acylethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth // Protoplasma. — 2005. — 226, № 3/4. — P. 109–123.

Поступила 15.02.11