

УДК 58.084+577.175.1+581.2+579.234

ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІАЛЬНИХ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ У РОСЛИН *ARABIDOPSIS THALIANA* ТА ЇХ МОДИФІКАЦІЯ

Ю.В. ШИЛІНА¹, М.І. ГУЩА¹, О.С. МОЛОЖАВА², Ю.І. ШЕВЧЕНКО²,
О.П. ДМИТРІЄВ¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук
України

03143 Київ, вул. Заболотного, 148

e-mail: j.shilina@gmail.com

²Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка

03022 Київ, просп. Глушкова, 2

Досліджено здатність нативних та оброблених фенолом ліпополісахаридів (ЛПС) із фітопатогенних і сапрофітних штамів бактерій *Pseudomonas aeruginosa* модифікувати стійкість рослин *Arabidopsis thaliana* до наступного зараження фітопатогенними бактеріями *Pseudomonas syringae* ІМВ 8511. Встановлено, що ЛПС бактеріального походження індукують підвищення або зниження стійкості рослин до фітопатогенних бактерій залежно від походження ліпополісахариду, його хімічного стану і генотипу рослин.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas aeruginosa*, ліпополісахарид, системна стійкість, саліцилова кислота, жасмонова кислота.

При вивченні взаємодії рослин з асоціативною та патогенною мікрофлорою важливим є питання щодо ролі поверхневих структур мікроорганізмів у розпізнаванні ними рослини-хазяїна та взаємодії з рослинними клітинами. ЛПС є одними з основних компонентів зовнішньої мембрани клітин грамнегативних бактерій, беруть участь у їх взаємодії з іншими організмами. У низці досліджень показано, що вони можуть виступати еліситором вродженого імунітету рослин. ЛПС залежно від походження ліпополісахариду та виду рослини-хазяїна здатні індукувати такі реакції рослинних клітин, як окиснювальний вибух, синтез NO, надходження іонів кальцію в клітини, зміни в клітинній стінці з відкладанням калози і фенольних сполук, індукцію або пригнічення реакції надчутливості [11, 13, 15]. Одним із найбільш вивчених ефектів ЛПС у рослин є їх здатність запобігати розвитку реакції надчутливості (РНЧ), індукованої авірулентними бактеріями і водночас потенціювати розвиток інших захисних реакцій [16]. Хоча сама обробка рослин ЛПС із різних бактерій може безпосередньо не індукувати синтез вторинних захисних сполук, вона праймує їх індукцію за подальшого бактеріального зараження [18]. ЛПС індукує чи потенціює експресію групи захисних або стресасоційованих генів, включаючи гени глутатіон-S-трансферази, цитохрому P₄₅₀, супероксиддисмутази, бета-1,3-глюканази, а також генів,

що кодують PR-білки, зокрема PR1 і PR2 [11, 13, 15, 18]. Індукована ЛПС експресія деяких захисних генів рослин відбувається як локально, так і системно [18].

Водночас відомо, що біологічна активність ЛПС значною мірою залежить від методу їх виділення, що впливає на фізичний стан їхніх молекул. Встановлено кореляцію між конформацією та біологічною активністю молекул ЛПС у тварин [7]. Біологічно активна конформація ЛПС залежить від їх обробки різними речовинами. Ефекти ЛПС часто досліджують за допомогою високоочишених препаратів, які отримують екстракцією з використанням речовин з окиснювальними властивостями. У разі обробки імуносупресивних ЛПС фенолом або трихлороцтовою кислотою вони переходили в неактивний стан [7].

Фосфоамідні залишки, вперше виявлені в складі ЛПС у фітопатогенної бактерії *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, дуже чутливі до кислих і лужних умов, які зазвичай мають місце при виділенні ЛПС. Можливо саме тому цю хімічну групу тривалий час не вдавалося виявити, хоча, як припускають, вона може бути досить поширеною в ЛПС бактерій [16]. Штучне дефосфорилування молекули ліпоолігосахариду за збереження одного негативного заряду на внутрішньому корі призвело до втрати ним здатності індукувати захисні реакції в *Arabidopsis thaliana*, що вказує на ключову роль у цих процесах заряджених груп фосфату, фосфоаміду і залишків галактуранової кислоти [16].

Зміна біологічних властивостей ЛПС у результаті хімічної обробки пов'язана зі зміною конформації молекул ЛПС. Як відомо, велику роль у реалізації різних властивостей ЛПС відіграє їх молекулярна форма (наприклад, високо- й низькоагреговані препарати ЛПС відрізняються за фазністю процесу антикомплементарної дії у тварин) [6]. Біологічна активність ЛПС залежить від конформації їхніх молекул і форми їх ліпідної частини [16]. Токсичність ліпідів А й відповідно ЛПС залежить від його структури і конформації, що, у свою чергу, визначається ковалентно зв'язаним з ліпідом А олігосахаридним кор-регіоном [16]. Хімічні модифікації вуглеводних залишків сприяють конформаційним змінам молекул ЛПС [3].

У попередній роботі ми виявили тенденцію до зміни фітотоксичної активності ЛПС у результаті їх хімічної обробки [5]. У патогенних для тварин штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* та фітопатогенного штаму *Burkholderia cepacia* токсичними для рослин були фенольні препарати ЛПС (аналоги ЛПС авірулентних для тварин штамів). У *Shigella sonnei* більшу фітотоксичну активність виявлено у редоксактивованого препарату (аналога ЛПС вірулентних штамів) [5]. Оскільки хімічна обробка може значно змінювати фітотоксичність препаратів ЛПС, то слід очікувати також змін імуномодулювальної активності ЛПС.

Метою нашої роботи було дослідження здатності нативних та оброблених фенолом ліпополісахаридів із фітопатогенних і сапрофітних штамів бактерій *Pseudomonas aeruginosa* модифікувати стійкість рослин *Arabidopsis thaliana* до наступного зараження фітопатогенними бактеріями.

Методика

Отримання ЛПС. Ліпополісахариди отримували з фітопатогенного штаму *Pseudomonas aeruginosa* ІМВ 9096 (ЛПС 9096) і сапрофітного штаму *P. aeruginosa* ІМВ 8614 (ЛПС 8614). Виділяли їх із клітин *P. aeruginosa*

способом м'якої екстракції 0,85 %-м розчином хлориду натрію, в результаті отримували нативний О-антигенний комплекс [2]. Біомасу бактерій нарощували на картопляному агарі. Бактеріальні клітини змивали 0,85 %-м розчином NaCl і суспендували на механічній мішалці протягом 4 год. Екстрагували 0,85 %-м розчином NaCl за кімнатної температури у 4-разовій повторності. Добути суспензії центрифугували при 5000 g на холоді (4 °C) протягом 40 хв, екстракти змішували, діалізували проти дистильованої води, центрифугували при 5000 g протягом 40 хв і ліофільно висушували.

Щоб отримати фенольні препарати, наважку ЛПС розчиняли у стерильній воді за 65–68 °C (на водяній бані) до утворення гомогенного розчину і додавали 90 %-й розчин фенолу, нагрітого до тієї ж температури (співвідношення 1 : 1). Суміш витримували протягом 30 хв на водяній бані за 65 °C, охолоджували і для видалення фенолу діалізували протягом трьох діб проти водопровідної води. Розчин ЛПС концентрували за 35–40 °C до вихідного об'єму.

Об'єкт дослідження. Насіння *A. thaliana* екотипу Columbia дикого типу (*Col-0 wt*) та двох ліній, дефектних за жасмонатною (*jin* — мутант, нечутливий до жасмонатів) і саліцилатною (*NahG* — трансгенні рослини, які містять бактеріальний ген саліцилатгідроксилази) сигнальними системами, після попередньої стерилізації висівали в чашки Петрі на 1 %-й агар і витримували протягом трьох діб за 2–4 °C. Після 5–7 діб пророщування (23–25 °C, фотоперіод 16 год, темрява 8 год) 5–7 проростків із двома сім'ядолями переносили в пластикові стаканчики зі стерильним ґрунтом. Далі рослини вирощували за температури 20–24 °C з фотоперіодом 10 год, темрява 14 год.

Обробка рослин ЛПС. Із літературних джерел відомі три методи обробки рослин препаратами ЛПС: 1) інокуляція за допомогою шприца; 2) занурення рослин у розчин ЛПС; 3) обприскування рослин розчином ЛПС. Ми обрали метод обприскування як найменш травматичний, найбільш близький до природних умов і придатний для широкого практичного застосування при обробці великої кількості рослин. Рослини обприскували водним розчином нативного (Н — неокисненого) та окисненого фенолом (Ф) ЛПС (100 мкг/мл у 0,01 %-му Tween 20), отриманим із патогенного (ЛПС 9096) і сапрофітного (ЛПС 8614) штамів *P. aeruginosa*.

Тестування стійкості рослин. Після чотирьох діб інкубації рослини обприскували суспензією *Pseudomonas syringae* IMB 8511 ($1 \cdot 10^9$ кл/мл, Tween 0,01) й утримували у вологій камері протягом 12–19 діб, періодично вели облік ураженості листків розетки. Обчислювали кількість ушкоджених листків (із різними симптомами) та ступінь їх ураження за формулою

$$Px = \frac{\sum ab}{Nk} 100 \% [4] \text{ (в нашій модифікації),}$$

де a — кількість листків із симптомами; b — бал ураження; N — загальна кількість листків; k — вищий бал шкали обліку в цьому досліді.

Результати оброблено статистично за допомогою пакета програм Microsoft Office Excel 2003 та Microsoft Office Graph 2003.

Результати та обговорення

Встановлено, що рослини *A. thaliana* мають різну чутливість до зараження бактеріями *P. syringae* IMB 8511 залежно від їх генотипу.

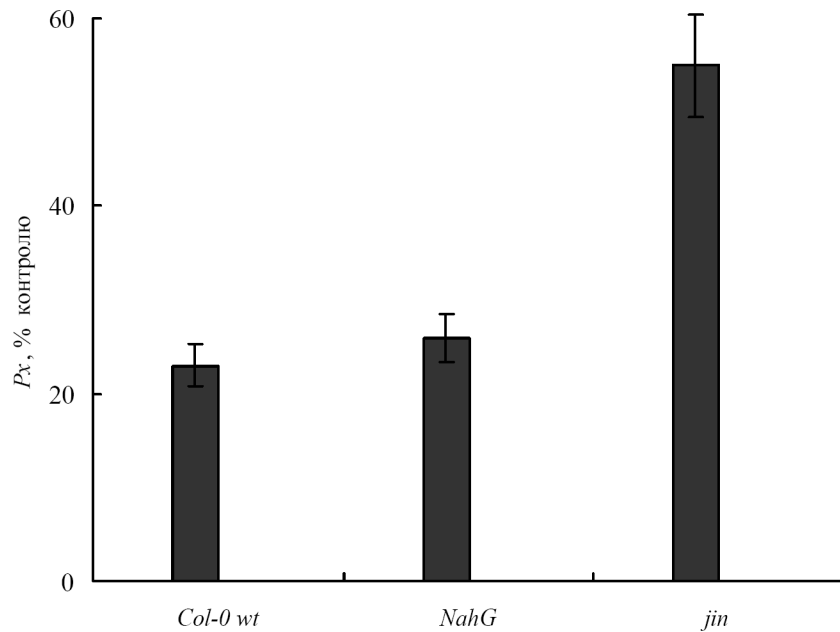


Рис. 1. Ураженість (P_x) рослин *Arabidopsis thaliana*, заражених бактеріями *Pseudomonas syringae* ІМВ 8511

Найвищим був ступінь ураження жасмонатдефіцитних рослин *jin*, помірним — саліцилатдефіцитних (*NahG*) і мінімальним — рослин дикого типу (*Col-0 wt*) (рис. 1).

Попередня обробка ЛПС чинила модифікувальний вплив на чутливість рослин до бактеріального зараження, що залежав від походження ЛПС (із сапрофітного чи фітопатогенного штаму), хімічного стану (нативний чи оброблений фенолом) і генотипу рослини (рис. 2).

У трьох незалежних серіях дослідів за обробки рослин нативним ЛПС 8614 із сапрофітного штаму ураженість (чутливість) рослин дикого типу *Col-0 wt* зростала, а *NahG* — зменшувалась (див. рис. 2, варіант 2). Ураженість рослин *jin* порівняно з контролем змінювалась неістотно.

Після обробки рослин нативним ЛПС 9096 із фітопатогенного штаму ураженість рослин усіх трьох генотипів зменшувалась. Однозначної залежності між ступенем ураженості і генотипом рослин не виявлено (див. рис. 2, варіант 3).

На відміну від нативного, оброблений фенолом ЛПС 8614 чинив найбільший захисний ефект у рослин усіх трьох генотипів (див. рис. 2, варіант 4). При цьому однозначної залежності ефекту від функціонування саліцилатної та жасмонатної сигнальних систем не спостерігали.

Оброблений фенолом ЛПС 9096 значно підвищував стійкість лише рослин дикого типу *Col-0 wt*, ураженість рослин лінії *NahG* дещо знижувалась, у *jin* ефект був відсутній, тобто однозначної залежності ефекту після обробки ЛПС 9096 від функціонування сигнальних систем також не виявлено (див. рис. 2, варіант 5).

Неоднозначна залежність модифікувального впливу ЛПС від функціонування саліцилатної та жасмонатної сигнальних систем може слугувати підтвердженням існування складної взаємодії між сигнальними шляхами цих фітогормонів. У базовому імунітеті рослин саліцилова кислота і жасмонова кислота у взаємодії з етиленом здатні синергічно

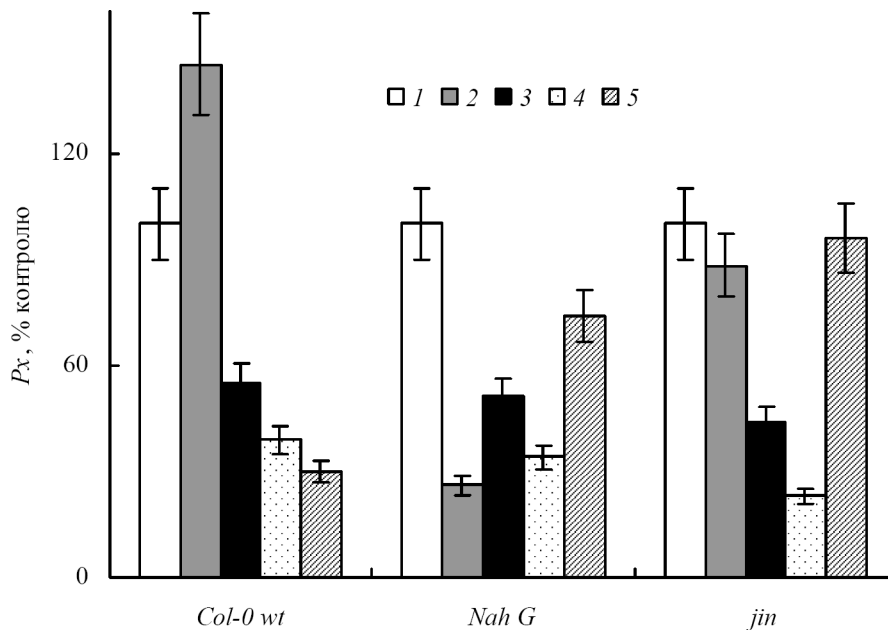


Рис. 2. Вплив ліпополісахаридів на ураженість (P_x) рослин *Arabidopsis thaliana* бактеріями *Pseudomonas syringae* 1MB 8511:

1 – вода (контроль), 2 – ЛПС 8614 (нативний), 3 – ЛПС 9096 (нативний), 4 – ЛПС 8614 (фенольний), 5 – ЛПС 9096 (фенольний)

посилювати імунну відповідь [8] або їх функціонування може зумовлювати адитивний ефект при розвитку захисних реакцій у рослин [18]. Крім того, не виключені антагоністичні ефекти на певних етапах цієї взаємодії. Є дані щодо впливу ЛПС на індуковану системну стійкість, залежну від жасмонатної сигнальної системи [13], та індукцію саліцилат-залежної системної набутої стійкості [12]. Встановлено також, що некротрофний бактеріальний патоген *P. syringae* при зараженні томатів здатний індукувати як саліцилат-, так і жасмонатзалежний каскад захисних реакцій [1]. Отже, вплив ЛПС на стійкість рослин реалізується через різні компоненти сигнальної системи.

Встановлену в наших дослідках імовірність не тільки захисного, а й імуносупресивного впливу ЛПС на рослини підтвердили також інші дослідники. Доведено, що ЛПС, як і інші екзополісахариди, здатні пригнічувати захисні реакції рослин [14]. Зокрема, ЛПС бульбочкових бактерій можуть діяти як супресори захисних реакцій рослини-хазяїна, що необхідно для інфікування і встановлення симбіотичних відносин [3]. Виявлено, що ліпід А *Sinorhizobium meliloti*, як і низькомолекулярні екзополісахариди та циклічний β -глюкан *B. japonicum*, може пригнічувати еліситор-індуковані захисні реакції рослини-хазяїна [3]. Ліпід А *S. meliloti* пригнічував утворення активних форм кисню у рослини-хазяїна *Medicago sativa* [13]. ЛПС патогенних агробактерій мають таку саму структуру, як у *S. meliloti*, що вказує на роль імуносупресії у взаємовідносинах фітопатогенних бактерій з рослинами-хазяїнами [13].

Одним із припущень щодо виявленого нами імуносупресивного впливу поверхневої обробки нативним ЛПС 8614, виділеним із сапрофітного штаму *P. aeruginosa*, на рослини *A. thaliana* дикого типу

Col-0 wt (див. рис. 2, варіант 2), є вплив ЛПС на функціонування продихів рослин. Доведено, що обробка рослин елісаторами, такими як флагелін flg22, фактор елонгації бактерій elf26 та ЛПС, індують швидке закриття продихів, що є одним із захисних механізмів рослин при зараженні патогенними бактеріями [10]. Результати експериментів із саліцилатдефіцитними рослинами *A. thaliana* — трансгенним *NahG*, мутантами *sid2/eds16*, *aba3* свідчать, що біосинтез саліцилової та абсцизової кислот необхідні для елісаторіндукованого закриття продихів [10]. На відміну від рослин дикого типу *Col-0 wt* обробка рослин *NahG* ЛПС 8614 справляла значний захисний ефект (див. рис. 2, варіант 2).

Одним із модуляторів «продихового імунітету» є лектинрецепторна кіназа-V.5 *A. thaliana* L-типу (LecRK-V.5) [10]. Відомо, що ЛПС взаємодіє з лектинрецепторними кіназами цього типу [9]. Можливо, вплив сапрофітного ЛПС активував цю кіназу і відкриття продихів, а зараження бактеріями потрапило в цей часовий інтервал толерантності.

Відмінність ефектів при обробці нативними і фенольними препаратами ЛПС свідчить про те, що захисний чи імуносупресивний ефект ЛПС у рослин визначається насамперед хімічною структурою ЛПС, яка залежить від способу його екстрагування. Вважають, що хімічна модифікація ЛПС моделює природні процеси, які відбуваються в молекулі ЛПС у разі втрати або набуття бактеріями вірулентності [7]. Відомо, що ліпід А чи інші структури ЛПС змінюються при формуванні симбіотичних відносин бактерій із рослинами та при патогенезі. Такі модифікації можуть підвищувати стійкість бактерій до захисних механізмів рослини-хазяїна або ослаблювати активність ліпідів й ЛПС стосовно запуску захисних реакцій [13].

Таким чином, встановлено, що ЛПС бактеріального походження індують підвищення або зниження стійкості рослин до фітопатогенних бактерій залежно від походження ліпополісахариду, його хімічного стану і генотипу рослин. Нативний ЛПС із сапрофітного штаму бактерій *P. aeruginosa* 8614 істотно підвищував стійкість рослин дефектних щодо саліцилатної сигнальної системи (*NahG*) і майже не впливав на рослини, дефектні щодо жасмонатної сигнальної системи (*jin*). Навпаки, обробка цим ЛПС призводила до значного зростання ушкодження рослин дикого типу. У разі обробки рослин нативним ЛПС із фітопатогенного штаму бактерій 9096 їх ураженість зменшувалась незалежно від генотипу. Оброблений фенолом ЛПС із сапрофітного штаму бактерій 8614 чинив найбільший захисний вплив на рослини усіх трьох генотипів. Фенольний ЛПС із фітопатогенного штаму 9096 підвищував стійкість лише рослин дикого типу *Col-0 wt*. У рослин із дефектними сигнальними системами виявлено як захист, так і відсутність впливу ЛПС у різних дослідках.

Отже, при визначенні перспективності використання того чи іншого ЛПС для підвищення стійкості рослин слід враховувати його походження, хімічний стан і генотип рослини.

1. Буров В.Н., Петрова М.О., Селицкая О.Г. и др. Индуцированная устойчивость растений к фитопатогенам. — М.: Т-во науч. изданий КМК, 2012. — 181 с.
2. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. — Киев: Наук. думка, 2006. — 237 с.
3. Коць С.Я., Моргул В.В., Патька В.Ф. и др. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобийный симбиоз. — Киев: Логос, 2010. — Т. 1. — 508 с.

4. *Методы* экспериментальной микологии: Справочник. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
5. *Моложавя О.С., Шилина Ю.В.* Фітотоксичність модифікованих ліпополісахаридів бактерій // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — Вип. 2 (11). — С. 76—82.
6. *Покровский В.И., Авербах М.М., Литвинов В.И., Рубцов И.В.* Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс. — М.: Медицина, 1979. — 280 с.
7. *Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів* / За ред. В.К. Позура. — К.: ВПЦ «Київський університет», 2003. — 305 с.
8. *Шамрай С.Н.* Иммунная система растений: базальный иммунитет // Цитология и генетика. — 2014. — **48**, № 4. — С. 67—82.
9. *Vouwmesteer K., Govers F.* Arabidopsis L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles // J. Exp. Bot. — 2009. — **60**, N 15. — P. 4383—4396.
10. *Desclos-Theveniau M., Arnaud D., Huang T.-Y. et al.* The Arabidopsis lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 // PLoS Pathog. — 2012. — **8**, N 2. — e1002513.
11. *Li C., Guan Z., Liu D., Raetz C.R.H.* Pathway for lipid A biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* resembling that of *Escherichia coli* // PNAS. — 2011. — **108**, N 28. — P. 11387—11392.
12. *Mishina T.E., Zeier J.* Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis // Plant J. — 2007. — **50**, N 3. — P. 500—513.
13. *Newman M.-A., Dow J.M., Molinaro A., Parrilli M.* Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides // J. Endotoxin Res. — 2007. — **13**. — P. 68—79.
14. *Nicaise V., Roux M., Zipfel C.* Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm // Plant Physiol. — 2009. — **150**. — P. 1638—1647.
15. *Silipo A., Erbs G., Shinya T. et al.* Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity // Glycobiology. — 2010. — **20**, N 4. — P. 406—419.
16. *Silipo A., Molinaro A., Sturiale L. et al.* The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris* // J. Biol. Chem. — 2005. — **280**, N 39. — P. 33660—33668.
17. *Van Wees S.C.M., de Swart E.A.M., van Pelt J.A. et al.* Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana* // PNAS. — 2000. — **97**, N 15. — P. 8711—8716.
18. *Zeidler D., Zahringer U., Gerber I. et al.* Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes // Ibid. — 2004. — **101**, N 44. — P. 15811—15816.

Отримано 29.08.2016

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ У РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* И ИХ МОДИФИКАЦИЯ

Ю.В. Шилина¹, Н.И. Гуца¹, О.С. Моложавя², Ю.И. Шевченко², А.П. Дмитриев¹

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

²Учебно-научный центр «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев

Исследована способность нативных и обработанных фенолом липополисахаридов (ЛПС) из фитопатогенных и сапрофитных штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* модифицировать устойчивость растений *Arabidopsis thaliana* к последующему заражению фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae* IMB 8511. Установлено, что ЛПС бактериального происхождения индуцируют повышение или снижение устойчивости растений к фитопатогенным бактериям в зависимости от происхождения липополисахарида, его химического состояния и генотипа растений.

Ю.В. ШИЛИНА, Н.И. ГУЩА, О.С. МОЛОЖАВАЯ, Ю.И. ШЕВЧЕНКО, А.П. ДМИТРИЕВ

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES IN
ARABIDOPSIS THALIANA PLANTS AND THEIR MODIFICATION

J.V. Shilina¹, M.I. Guscha¹, O.S. Molozhava², J.I. Shevchenko², A.P. Dmitriev¹

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

²Educational and Scientific Centre «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National
University
2 Glushkov Av., Kyiv, 03022, Ukraine

The effect of native and treated with phenol lipopolysaccharides, derived from pathogenic and saprophytic strains of *Pseudomonas aeruginosa*, on resistance to phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* IMB 8511 of *Arabidopsis thaliana* plants was investigated. The raising or lowering of plant resistance to pathogenic bacteria depended on the origin of LPS, their chemical status, and plants genotype.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas aeruginosa*, lipopolysaccharides, system resistance, salicylic acid, jasmonic acid.