



УДК 577.125.5

© 2012

І. В. Покотило, В. С. Кравець, Я. Мартінець

## Реакція фосфоліпази D суспензійної культури клітин тютюну на дію осмотичного й сольового стресів

(Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем)

*Визначено вплив чинників осмотичного й сольового стресів на реакцію фосфоліпази D суспензійної культури клітин тютюну ВУ-2. Встановлено зміни активності формування вторинних месенджерів ліпідної природи та позитивну динаміку зростання внутрішньоклітинного рівня фосфатидної кислоти, що свідчить про активацію фосфоліпази D при гіперосмотичній дії манітолу, а також в умовах впливу солі NaCl. З'ясовано залучення фосфоліпаз до первинної регуляції метаболізму рослин та сигналіngu в стресових умовах.*

Поширеність у природних умовах чинників сольового й осмотичного стресів та ступінь їх негативного впливу на процеси метаболізму зумовлює їхнє позиціонування серед ключових лімітуючих факторів росту і продуктивності рослин. Дослідження механізмів рецепції стресових станів, особливостей розвитку адаптивних реакцій рослин є одним з важливіших питань біології. На клітинному рівні дія сольового й осмотичного стресів спричиняє швидку втрату тургорного потенціалу, порушення іонного транспорту, пригнічення фотосинтезу та зростання інтенсивності цитотоксичних оксидативних реакцій [1]. Однак рослинні організми розвинули здатність на метаболічному рівні реагувати на змінні умови росту та при необхідності активувати компенсаторні механізми. Відомо, що клітинні мембрани можуть слугувати місцем первинної рецепції екстрацелюлярних стимулів та здатні відігравати роль джерела продукції сигнальних молекул [2]. Саме тому серед посередників сприйняття стресового впливу та медіаторів ініціації регуляторних каскадів розглядаються фосфоліпази, що є мембрано-зв'язаними ферментами, здатними гідролізувати полярні фосфоліпіди з утворенням внутрішньоклітинних вторинних месенджерів. Раніше було встановлено, що клітинний фосфоліпідний сигналінг є одним з первинних механізмів, залучених до регуляції низки клітинних функцій, включаючи функціонування сигнальної системи іонів  $Ca^{2+}$  [3], та до опосередкування регуляторних функцій фітогормонів цитокінінів [4] тощо. Крім того, було з'ясовано, що активація фосфоліпаз спостерігається на ранніх етапах дії низки чин-

ників як абіотичних [2], так і біотичних стресів [5], а фосфатидна кислота, діацилгліцерол, фосфоінозитолі та інші сигнальні молекули фосфоліпідного походження залучаються до регуляції процесів метаболізму та фізіологічних реакцій рослин у стресових умовах. Більше того було показано, що пригнічення експресії генів фосфоліпаз або інгібування їх активності спричинює значну втрату стійкості та продуктивності модельних рослин при дії стресів [6].

Метою нашого дослідження було визначення динаміки рівня продукції фосфатидної кислоти в умовах дії чинників осмотичного й сольового стресів у суспензійній культурі клітин тютюну.

**Експериментальна частина.** Об'єктом дослідження була суспензійна культура клітин тютюну ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* культивар BrightYellow-2). Середовище культивування містило 4,3 г/л солей MS ("Sigma"), 1 г/л тіаміну, 200 мг/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 мг/л міоінозитулу, 30 г/л сахарози та 0,9 мкмоль/л 2,4-дихлорофеноксіацетату (рН 5,8). Клітини вирощували в темряві при 26 °С на обертальному шейкері. Кожен сім діб культивування проводився пасаж 3 мл клітин у 100 мл свіжого середовища. Для експериментів використовували тридобові клітини суспензійної культури, що нормалізовані до концентрації сирової ваги 0,056 г/мл.

Для отримання кількісного аналізу продуктів гідролізу фосфоліпідів використовувався мічений субстрат фосфатидилхолін-L- $\alpha$ -дипальмітоїл, що містить радіоізоотоп  $\text{C}^{14}$  у *sn*-1 залишку жирної кислоти (American Radiolabeled Chemicals). Дослідні проби інкубували з попередньо підготовленими ліпосомами, що містили мічений фосфоліпід з сумарною радіоактивністю у 100 000 розпадів на хвилину. Ліпіди екстрагували сумішню метанол : хлороформ 2 : 1 з подальшим розділенням фаз при додаванні 1 моль/л розчину КСl. Виділені ліпіди та стандарти ліпідів наносили на НР-TLC силікагелеві пластини ("Merck") автоматичним самплером ATS 4 ("SAMAG") та розділяли у горизонтальній хроматографічній камері сумішню хлороформ : метанол : вода відповідно 65 : 25 : 4. Після розділення фаз проводили експозицію мічених ліпідів на пластині фосфовізуалізації ("Fujifilm") впродовж 12 год. Для підрахунку відносних одиниць флуоресценції продуктів гідролізу ліпідів пластини фосфовізуалізації сканувались лазерним флуоресцентним сканером FLA-7000 ("Fujifilm").

**Результати дослідження та їх обговорення.** Результати аналізу проведених експериментів вказують на зростання продукції фосфатидної кислоти у суспензійній культурі клітин тютюну у відповідь на дію чинників сольового й осмотичного стресів, а також на активацію фосфоліпази D (рис. 1, 2). Дія сольового стресу у рослин розглядається як поєднання гіперосмолярного впливу та токсична дія іонів  $\text{Na}^+$ , в окремих випадках — іонів  $\text{Cl}^-$ , що з часом акумулюються у плазмалемі та порушують фізіологічний баланс іонів  $\text{K}^+$  й  $\text{Ca}^{2+}$ . Встановлено, що пригнічувальна дія осмотичного компонента сольового стресу у більшості випадків є переважаючою та відбувається на значно більш ранніх етапах його дії, в той час як токсичний вплив іонів солей є домінуючим лише в окремих чутливих видів. Нами було показано, що дія 50 ммоль/л солі NaCl у суспензійній культурі клітин тютюну ВУ-2 зумовлює концентраційнозалежне зростання рівня продукції фосфатидної кислоти на 10% після 1-ї год та на 25% після 2-х год дії стресового чинника (див. рис. 1). Крім того, більш довготривала дія засолення викликала подальше зростання активності фосфоліпази D, про що свідчило більш ніж дворазове зростання продукції фосфатидної кислоти після 6-ти год дії 100 ммоль/л солі NaCl (див. рис. 2). Раніше активація окремих ізоформ фосфоліпаз D спостерігалася при дії сольового [7] й осмотичного стресів [8] у модельних рослин арабідопсису, рису [9], у зелених водоростей *Chlamidomonas Moewusii* [10] та в інших рослинних об'єктах.

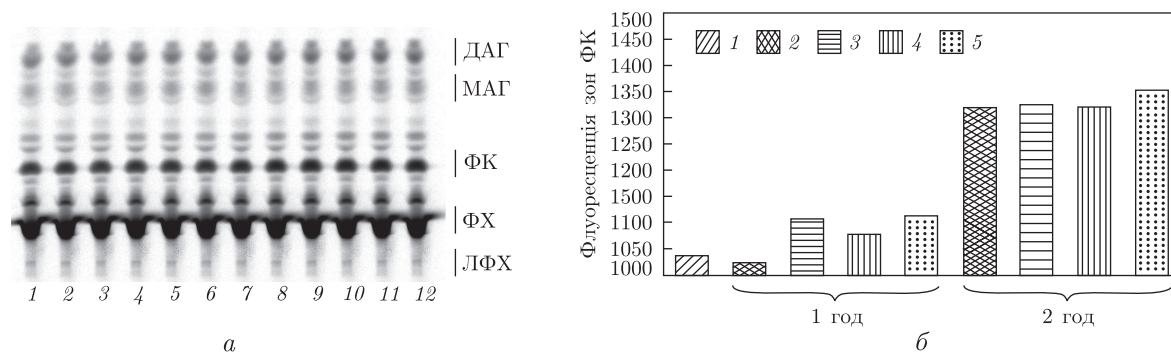


Рис. 1. Вплив манітолу та солі NaCl на рівень продукції фосфатидної кислоти у суспензійній культурі клітин тютюну BY-2.

а: Фосфоровізуалізація хроматографічного розділення  $C^{14}$ -мічених ліпідів [1, 2 – контроль (1 год); 3 – NaCl 50 ммоль/л (1 год); 4 – NaCl 100 ммоль/л (1 год); 5 – манітол 50 ммоль/л (1 год); 6 – манітол 100 ммоль/л (1 год); 7, 8 – контроль (2 год); 9 – NaCl 50 ммоль/л (2 год); 10 – NaCl 100 ммоль/л (2 год); 11 – манітол 50 ммоль/л (2 год); 12 – манітол 100 ммоль/л (2 год)].

б: Рівень продукції фосфатидної кислоти [1 – контроль; 2 – NaCl 50 ммоль/л; 3 – NaCl 100 ммоль/л; 4 – манітол 50 ммоль/л; 5 – манітол 100 ммоль/л].

Тут і на рис. 2: ДАГ – діацилгліцерол; МАГ – моноацилгліцерол; ФК – фосфатидна кислота; ФХ – фосфатидилхолін; ЛФХ – лізофосфатидилхолін

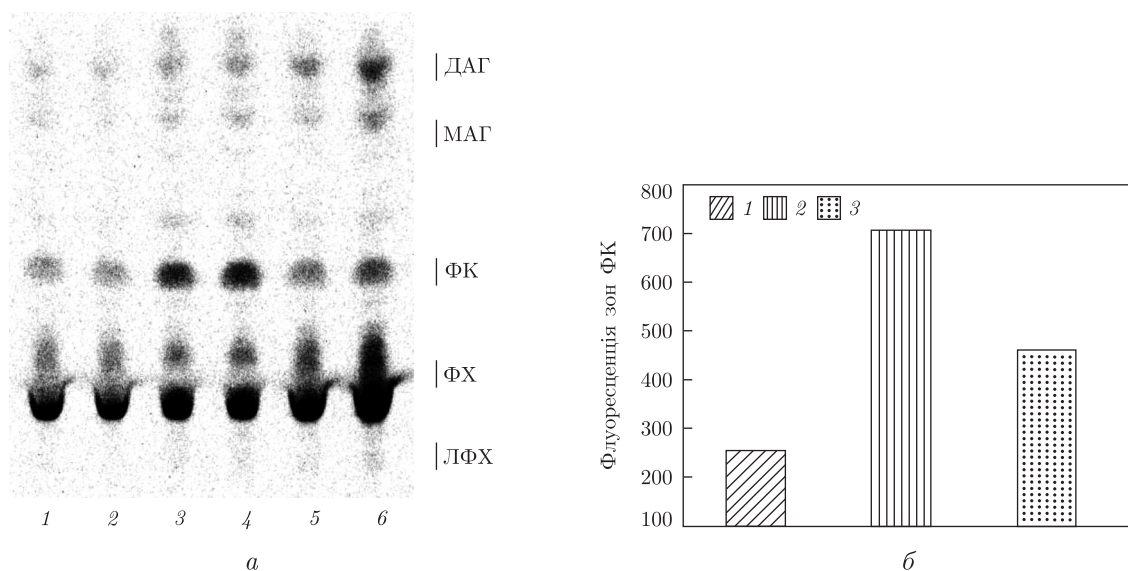


Рис. 2. Вплив манітолу та солі NaCl на рівень продукції фосфатидної кислоти у суспензійній культурі клітин тютюну BY-2.

а: Фосфоровізуалізація хроматографічного розділення  $C^{14}$ -мічених ліпідів [1, 2 – контроль; 3, 4 – NaCl 100 ммоль/л (6 год); 5, 6 – манітол 100 ммоль/л (6 год)].

б: Підрахунок рівня продукції фосфатидної кислоти [1 – контроль; 2 – NaCl 100 ммоль/л; 3 – манітол 100 ммоль/л]

У процесі проведених нами дослідів було встановлено залучення фосфатидної кислоти, що продукується внаслідок гідролізу фосфоліпідів за участю фосфоліпаз, до процесів внутрішньоклітинного сигналіngu, спрямованих на розвиток адаптивних реакцій рослинного організму в умовах дії засолення. Вірогідна роль фосфатидної кислоти поля-

гає в її здатності впливати на фізичні параметри мембран клітини, виконувати функції прекурсора біосинтезу інших сигнальних сполук, а також специфічно взаємодіяти з білками-мішенями, опосередковуючи їх активацію. Наприклад, було встановлено участь фосфатидної кислоти в регуляції активності МРК-6 кінази в арабідопсису за умов дії засолення [11].

Вплив надлишкових концентрацій полігідроксильованого спирту манітолу на клітини рослин дає змогу оцінити особливості перебігу реакцій метаболізму в умовах дії осмотичного стресу. Завдяки проведених нами досліджень встановлено, що дія манітолу також викликала зростання активності фосфоліпази D у суспензійній культурі клітин тютюну. Рівень продукції фосфатидної кислоти зростав на 15% через 1 год та на 35% через 2 год дії манітолу в концентраціях, обумовлюючих гіперосмолярність середовища росту клітин (див. рис. 1). Згідно з результатами аналізу, більш тривалий вплив стресора зумовив подальше зростання активності продукції фосфатидної кислоти порівняно з контролем після 6-ти год дії 100 ммоль/л манітолу (див. рис. 2).

Знижений рівень активації фосфоліпази D у випадку дії манітолу може пояснюватись як відносно меншим рівнем осмотичної сили стресора, так і різницею в характері його впливу на клітини суспензійної культури. Можна припустити, що роль фосфатидної кислоти за умов водного дефіциту та дії осмотичного стресу реалізується шляхом регуляції рівня транспірації та обмеження інтенсивності втрати води шляхом закриття продихів [12]. Також залучення фосфатидної кислоти до процесів адаптації метаболізму за умов дії стресорів може відбуватися за опосередкування фосфатидної кислоти зв'язуючих білків рослин, серед яких БТШ-90, 14-3-3 білки, білок фосфоенліпуват карбоксилази та SnRK2 кінази тощо [13].

Цікаво відзначити, що все більше експериментальних підтверджень знаходить положення про те, що біологічні системи суспензійних культур клітин можуть використовуватись як об'єкти результативних досліджень реакцій рослинного метаболізму за фізіологічних умов та за умов дії стресів, а також як мішені ефективного привнесення фізіологічно активних речовин з метою вивчення клітинної відповіді на їх дію. Було встановлено, що екзогенна дія проліну та бетаїну за умов дії сольового стресу в суспензійній культурі клітин ВУ-2 сприяла зростанню загальної антиоксидантної активності [14], натомість активація експресії захисного гену глутатіон пероксидази у клітин ВУ-2 в умовах засолення відбувалась за опосередкуванням внутрішньоклітинної продукції пероксиду водню [15].

Таким чином, у ході проведених досліджень встановлено, що клітини суспензійної культури тютюну ВУ-2 реагують на зміну умов росту, і на початкових стадіях дії чинників сольового й осмотичного стресів у них спостерігається активація продукції фосфатидної кислоти за участю фосфоліпази D. Отримані дані свідчать про залучення фосфоліпаз, а також вторинних месенджерів ліпідної природи, продукцію яких вони забезпечують, у процесі ініціації сигналіngu та регуляції адаптивних реакцій рослинного організму за несприятливих умов росту.

*Роботу виконано за фінансової підтримки Міжнародного фонду Вишеград та ЦНП 9.1-07.*

1. *Abogadallah G. M.* Antioxidative defense under salt stress // *Plant Signal. and Behavr.* – 2010. – 4, No 5. – P. 369–374.
2. *Li W., Li M., Zhang W. et al.* The plasma membrane-bound phospholipase D[delta] enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Nat Biotechnol.* – 2004. – 4, No 22. – P. 427–433.

3. Parre E., Ghars M. A., Leprince A.-S. et al. Calcium Signaling via Phospholipase C Is Essential for Proline Accumulation upon Ionic But Not Nonionic Hyperosmotic Stresses in Arabidopsis // *Plant Physiol.* – 2007. – **1**, No 144. – P. 503–512.
4. Kravets V. S., Kolesnikov Y. S., Kretynin S. V. et al. Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in Amaranthus assay system // *Physiol. Plant.* – 2010. – **3**, No 138. – P. 249–255.
5. Andersson M. X., Kourtchenko O., Dangl J. L. et al. Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1 – and AvrRpt2-induced disease resistance responses in Arabidopsis thaliana // *The Plant J.* – 2006. – **6**, No 47. – P. 947–959.
6. Shen P., Wang R., Jing W., Zhang W. Rice Phospholipase D $\alpha$  is Involved in Salt Tolerance by the Mediation of H<sup>+</sup> – ATPase Activity and Transcription // *J. Integrat. Plant Biol.* – 2011. – **4**, No 53. – P. 289–299.
7. Bargmann B. O. R., Laxalt A. M., Riet B. T. et al. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants // *Plant and Cell Physiol.* – 2009. – **1**, No 50. – P. 78–89.
8. Hong Y., Pan X., Welti R., Wang X. The effect of phospholipase D $\alpha$ 3 on Arabidopsis response to hyperosmotic stress and glucose // *Plant Signal. and behav.* – 2008. – **12**, No 3. – P. 1099–1100.
9. Darwish E., Testerink C., Khalil M. et al. Phospholipid Signaling Responses in Salt-Stressed Rice Leaves // *Plant and Cell Physiology.* – 2009. – **5**, No 50. – P. 986–997.
10. Munnik T., Meijer H. J. G., Ter Riet B. et al. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate // *The Plant J.* – 2000. – **2**, No 22. – P. 147–154.
11. Yu L., Nie J., Cao C. et al. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana // *New Phytolog.* – 2010. – **3**, No 188. – P. 762–773.
12. Jacob T., Ritchie S., Assmann S. M., Gilroy S. Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1999. – **21**, No 96. – P. 12192–12197.
13. Testerink C., Munnik T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants // *J. Exp. Bot.* – 2011. – **7**, No 62. – P. 2349–2361.
14. Hoque M. A., Okuma E., Banu M. N. et al. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities // *J. Plant Physiol.* – 2007. – **5**, No 164. – P. 553–561.
15. Avsian-Kretchmer O., Gueta-Dahan Y., Lev-Yadun S. et al. The Salt-Stress Signal Transduction Pathway That Activates the gpx1 Promoter Is Mediated by Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Different from the Pathway Induced by Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // *Plant Physiol.* – 2004. – **3**, No 135. – P. 1685–1696.

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
НАН України, Київ  
Інститут експериментальної ботаніки  
АН Чеської Республіки, Прага*

*Надійшло до редакції 12.09.2011*

**И. В. Покотило, В. С. Кравец, Я. Мартинец**

### **Реакция фосфолипазы D суспензионной культуры клеток табака на действие осмотического и солевого стрессов**

*Определено влияние факторов осмотического и солевого стрессов на реакцию фосфолипазы D суспензионной культуры клеток табака ВУ-2. Установлены изменения активности формирования вторичных мессенджеров липидной природы и положительную динамику роста внутриклеточного уровня фосфатидной кислоты, что свидетельствует об активации фосфолипазы D при гиперосмотическом действии маннитола, а также в условиях воздействия соли NaCl. Выяснено вовлечение фосфолипаз в первичную регуляцию метаболизма растений и сигналинга в стрессовых условиях.*

I. V. Pokotylo, V. S. Kravets, J. Martinec

**Reaction of phospholipase D in tobacco suspension cell culture to osmotic and salt stress influence**

*The influence of osmotic and salt stress factors on the reaction of phospholipase D in tobacco BY2 suspension culture cells has been studied. Changes in the activity of the formation of lipid second messengers and a positive dynamics of phosphatidic acid intracellular accumulation have been identified, indicating the phospholipase D activation by the hyperosmotic action of mannitol and under salt stress conditions induced by NaCl. Implication of phospholipases to the regulation of primary plant metabolism responses and signaling under stress conditions is established.*