

На правах рукописи

**Рыкун**  
Ольга Васильевна

**Участие аденилатциклазной сигнальной системы вакуолей столовой свеклы в трансдукции внутриклеточных сигналов при биотическом стрессе**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Иркутск, 2013**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, г. Иркутск

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Романенко Анатолий Сидорович**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук

**Осипова Светлана Владимировна**

доктор биологических наук,  
профессор

**Каримова Фатима Габдулладзяновна**

**Ведущая организация:** Научно-исследовательский институт биологии при Иркутском государственном университете

Защита диссертации состоится «19» марта 2013 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952) 510754; e-mail: [matmod@sifibr.irk.ru](mailto:matmod@sifibr.irk.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан «18» февраля 2013 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 003.047.01,

кандидат биологических наук



**Г.П. Акимова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одной из важнейших проблем, как в физиологии человека и животных, так и в физиологии растений, остается устойчивость организмов к стрессу. В настоящее время лучше всего изучены процессы, происходящие на начальном и конечном этапах восприятия и ответной реакции растительного организма на стрессовое воздействие (Swindell, 2006; Akram, 2008). Однако внутриклеточные процессы, связующие эти два этапа, остаются мало исследованными. В последние годы методами биоинформатики создаются схемы организованных в сеть сигнальных путей, дешифрующих и дифференцирующих входящие сигналы для индукции экспрессии определенных генов (Klamm, Kamp, 2011; Ballerstein et al., 2012), но отсутствие биохимических данных по исследуемым системам пока не позволяет создать полноценную модель. При этом, весьма актуальным является изучение молекулярных механизмов, обеспечивающих восприятие и трансдукцию внутриклеточных сигналов, в том числе при инфицировании фитопатогенами, на различных этапах покоя соответствующих органов растений.

В рамках этой проблемы возникает вопрос о возможном участии внутриклеточных структур в трансдукции сигналов. В последние годы появились данные о прямом и ретроградном сигналинге, функционирующих в несущих геном компартментах клеток растений, таких как ядра, хлоропласты и митохондрии (Юрина, Одинцова, 2007). Что касается роли других органелл во внутриклеточной трансдукции сигналов, то эта тема является совершенно не разработанной. В полной мере это относится к вакуолям растительных клеток. Традиционно считается, что одной из важных функций вакуоли является запасание каких-либо метаболитов. Однако уже есть сведения, указывающие на то, что в вакуолях функционируют компоненты аденилатциклазной (Ломоватская и др., 2010), а также НАДФН-оксидазной сигнальных систем (Прадедова и др., 2011; Андреев, 2012). В связи с этим, весьма актуальным является изучение участия вакуоли растительной клетки в трансдукции внутриклеточных сигналов, поскольку она может занимать до 90% пространства клетки, контактируя при этом со всеми внутриклеточными мембранами, что позволяет ей достаточно быстро обмениваться сигнальными молекулами с другими компартментами.

**Цель и задачи исследований.** Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния ионов кальция и пероксида водорода на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы вакуолей столо-

вой свеклы при биотическом стрессе (инфицирование корнеплодов *Botritis cinerea* L.) на различных этапах покоя корнеплода.

Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику изменения концентрации цАМФ в «солевых» и «сахарных» вакуолях, изолированных из корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), а также во вневакуолярном пространстве под воздействием биотического стрессора на различных стадиях покоя корнеплода: начала и глубокого покоя.

2. Исследовать влияние различных концентраций перекиси водорода и ионов кальция на динамику уровня цАМФ в «солевых» и «сахарных» вакуолях и за их пределами в норме и под воздействием биотического стрессора в те же периоды покоя.

3. Идентифицировать и изучить изменение активности связанной с тонопластом и растворимой аденилатциклаз вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) под влиянием различных концентраций перекиси водорода и кальция при биотическом стрессе на различных стадиях покоя корнеплода.

**Научная новизна.** Установлено, что в вакуолях клеток паренхимы столовой свеклы присутствуют ключевые компоненты аденилатциклазной сигнальной системы: две формы аденилатциклаз – тонопластная (тАЦ), растворимая (рАЦ), а также продукт их реакции - цАМФ, выполняющий роль вторичного мессенджера. Соотношение уровней цАМФ в вакуолях двух типов - «солевых» и «сахарных» и во вневакуолярном пространстве значительно отличалось в различные периоды покоя: в начале покоя уровень этой молекулы во вневакуолярном пространстве преобладал над внутривакуолярным, тогда как в глубоком покое основной пул цАМФ был сосредоточен в вакуолях. На всех этапах покоя более высокая концентрация цАМФ, активности рАЦ и тАЦ наблюдались в «солевых» вакуолях. По сравнению с периодом начала покоя, в глубоком покое активность тАЦ обоих типов вакуолей возрастала. Ионы кальция оказывали более сильный эффект на активность обеих форм ферментов, чем пероксид водорода. Инфицирование грибом *Botritis cinerea* модулировало активность аденилатциклазной сигнальной системы вакуолей: в начальный период покоя ингибировало тАЦ и почти не влияло на рАЦ в обоих типах вакуолей, а при глубоком покое подавляло тАЦ в «солевых» и стимулировало активность рАЦ в «сахарных» вакуолях. При инфицировании степень активации тАЦ и рАЦ экзогенными ионами кальция и пероксидом водорода существенно снижалась на обеих фазах покоя, за исключением повышения активности обеих форм АЦ в «сахарных» вакуолях при глубоком покое.

**Теоретическая и практическая значимость работы:** В данной работе впервые показано, что вакуоль клеток корнеплодов может выполнять сигнальные функции, индуцируя внутриклеточные сигналы с помощью компонентов аденилатциклазного сигнального пути. Активность этой сигнальной

системы вакуолей тесно взаимосвязана с физиологическим состоянием корнеплода. Выявление различных эффектов от ионов кальция и пероксида водорода на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы добавляет доказательства перекрестного влияния сигнальных путей на уровне органелл. Это вносит вклад в развитие теории внутриклеточной трансдукции сигналов у растений и участия вакуолей в этом процессе.

Материалы диссертации могут быть включены в курс лекций по сигналингу клеток растений и физиологии растений, а также использоваться в профильных научно-исследовательских институтах РАН, РАМН и РАСХН.

**Апробация работы.** Результаты исследований по теме диссертации были представлены в устных докладах на 14 Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2010); на IV Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз России» (Воронеж, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 1 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы (398 источников, из них 132 отечественных). Работа изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 12 рисунков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Растительным материалом служили корнеплоды столовой свёклы (*Beta vulgaris* L.) сорта Бордо. В работе использовали покоящиеся корнеплоды, находящиеся в фазах начала и глубокого покоя (хранение при температуре +4°C). Биотический стресс создавали заражением здоровых корнеплодов мицелием фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea*, чистая культура которого была получена из НИИ СХ (г. Москва). После чего корнеплоды хранились при температуре +4°C, на протяжении 14 дней. При выделении вакуолей из инфицированных корнеплодов столовой свеклы некротизированную паренхиму удаляли и использовали соседние живые ткани, не содержащие гифов гриба.

**Методы.** Выделение вакуолей из ткани корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) проводили модифицированным методом, разработанным в лаборатории физиологии растительной клетки СИФИБР СО РАН (Саляев и др., 1981). В градиенте плотности сахарозы получали две фракции вакуолей: фракция “сахарных” вакуолей располагалась между слоями с плотностями 1.080 и 1.145 г/см<sup>3</sup>; а фракция “солевых” вакуолей – между слоями с плотностями 1.050 и 1.080 г/см<sup>3</sup>. Фракции отбирали, суспендировали в среде (6.5 mM трис/HCl (pH 7.4), 1 M KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) и центрифугировали 10 мин при 100g. Чистоту фракций (осадок) контролировали, используя световой микроскоп. Кроме того, о чистоте фракций вакуолей судили по отсутствию в них ДНК (Гааль и др., 1982). Все этапы выделения проходили при комнатной

температуре, за исключением центрифугирования, которое осуществляли при 4°C.

Для получения фракции тонопласта 1 мл суспензии вакуолей ресуспендировали в 10 мл гипотонического раствора, состоящего из 1мМ Трис-НСl, рН 7.4, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола, затем суспензию несколько раз пропускали через иглу шприца, что приводило к осмотическому шоку вакуолей и образованию везикул вакуолярных мембран, после чего центрифугировали 15 мин при 15000g. Надосадочную жидкость, содержащую везикулы тонопласта в гипотонической среде, центрифугировали 90 мин при 105000g. Супернатант использовали для определения активности растворимой аденилатциклазы (pAC), осадок (тонопласт) ресуспендировали в 50мМ Трис-НСl, рН 7.4 и хранили при -80°C.

Количество пероксида водорода в вакуолях корнеплода столовой свеклы определяли при помощи FOX-метода, основанного на изменении окраски ксиленолового оранжевого (Galletti, 2008). Общий кальций в пробах определяли атомно-абсорбционным анализом в институте геохимии Сибирского отделения Российской академии наук (г. Иркутск).

Для изучения влияния ионов кальция или пероксида водорода на уровень цАМФ к суспензии вакуолей в среде ресуспендирования добавляли приготовленные на этой же среде растворы различных концентраций CaCl<sub>2</sub> или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 нМ – 7 мкМ) с присутствием 0.1 мМ теofilлина - ингибитора фосфодиэстеразы цАМФ. Образцы инкубировали в течение 20 с и суспензию центрифугировали при 14000g 40 с. В супернатанте (среда инкубации вакуолей) в дальнейшем определяли уровень цАМФ, а осадок вакуолей промывали в среде следующего состава: 6.5 мМ трис/НСl (рН 7.4), 1 М KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, плотностью 1.043 - 1.045 г/см<sup>3</sup>. Затем осадок вакуолей помещали в гипотоническую среду (1мМ Трис-НСl, рН 7.4, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0.1 мМ 2-меркаптоэтанола) для высвобождения вакуолярного сока. После чего все образцы кипятили на водяной бане (3 мин) для инактивации ферментов и разрушения тонопласта и определяли в них уровень цАМФ.

Период полураспада вакуолей составлял в наших опытах около 10 час. Время проведения экспериментов не превышало 15 мин, в течение которых при обработке вакуолей любыми опытными растворами разрушения тонопласта не наблюдалось, что проверяли наблюдением в световом микроскопе, а также судили по отсутствию изменения оптической плотности β-цианинов.

Для повышения специфичности иммуноферментного анализа (ИФА) к цАМФ, растительные образцы очищали от присутствия других циклических нуклеотидов на колонке с нейтральной окисью алюминия с параллельным анализом спектра веществ с помощью хроматографического оборудования ("Uvicord", Швеция) при длине волны 276 нм. Стандартами служили аденозин, 5'-АМФ, цАМФ, цГМФ, цТМФ и цЦМФ. Элюат концентрировали на роторном испарителе и при помощи ИФА определяли количество цАМФ (Lomovatskaya et al., 2012). Расчет количества цАМФ в пробе вели на мг бел-

ка (Lomovatskaya et al., 2012). Белок в растительном образце определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Для определения активностей растворимой и связанной с тонопластом аденилатциклаз (рАЦ и тАЦ, соответственно) фракции вакуолей гомогенизировали в растворе следующего состава: 1мМ трис-НСl, рН 7.4, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0.1 мМ 2-меркаптоэтанола и центрифугировали при 105000 g 3 ч. Полученный осадок (тонопласт) использовали для определения активности тАЦ, а супернатант – для определения активности рАЦ. Реакцию начинали с внесения растительного белка (100-150) мкг в 500 мкл инкубационной среды: 50 мМ трис-НСl, рН 7.2, 0.1 мМ теофиллин, 1мМ дитиотреитол, 0.5 мМ АТФ. В качестве кофактора для тАЦ использовали MgSO<sub>4</sub> (3 мМ), а для рАЦ – MnCl<sub>2</sub> (3 мМ). Реакцию проводили при 27°C в течение 30 мин и останавливали кипячением в течение 3 мин на водяной бане. Об активности аденилатциклазы судили по возрастанию количества цАМФ в пробе, рассчитанному на мг белка в мин.

Полученные результаты обрабатывали статистически, с вычислением ошибки среднего. Значимость различий между вариантами опыта анализировали по критерию Стьюдента (Брехман, 1970; Кошникович, 2006). Каждый эксперимент проводился в трех биологических (на протяжении 3 лет) и 8 аналитических повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Влияние Ca<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и биотического стресса на активность аденилатциклазной сигнальной системы вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы**

**1. Синтез цАМФ.** Показателем активности аденилатциклазной сигнальной системы (АСС) является уровень цАМФ (Николаев, 2011). В настоящей работе уровни цАМФ определяли во фракциях «сахарных» и «солевых» вакуолей (рис. 1) и в среде их инкубации на разных стадиях покоя, а также на фоне биотического стресса (инфицирование грибом *Botritis cinerea*).

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что в **фазе начального покоя** «солевые» и «сахарные» вакуоли, выделенные из неинфицированных тканей корнеплода, существенно отличались по содержанию цАМФ. Так, в «солевых» вакуолях уровень данного вторичного мессенджера был выше, чем в «сахарных». Однако во вневакуолярном пространстве этот показатель преобладал в «сахарных» вакуолях. Характерно, что в этой фазе покоя почти весь пул цАМФ находился не в вакуолях обоих типов, а за их пределами.

Ионы кальция значительно повышали уровень цАМФ только в «солевых» вакуолях. При этом количество цАМФ в среде инкубации в сравнении с таковым внутри «солевых» вакуолей было меньше аналогичного показателя в контроле (табл.1). У «сахарных» вакуолей различные концентрации кальция не

оказывали влияния на уровни цАМФ в вакуолях и за их пределами. Пероксид водорода в пределах испытанных концентраций на количественные показатели цАМФ в обоих типах вакуолей и среде их инкубации также почти не влиял (табл.1).

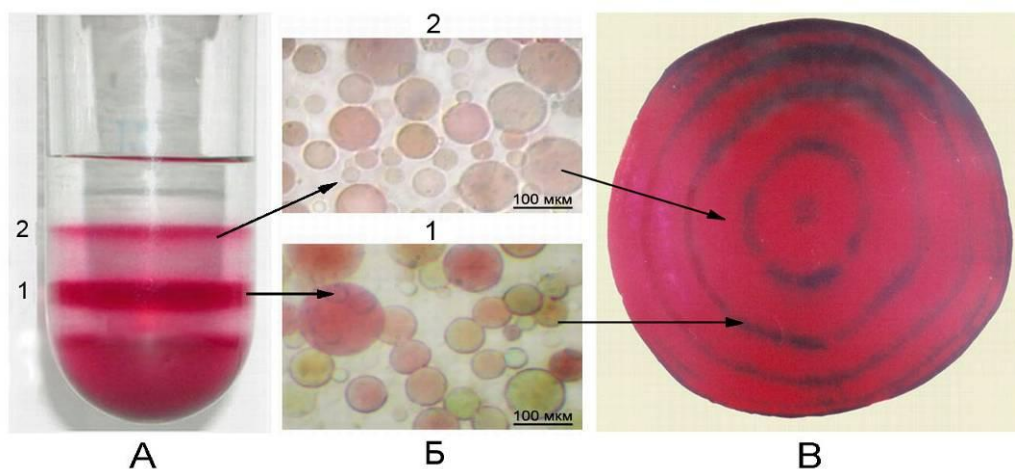


Рис.1. А - «сахарные» и «солевые» вакуоли в градиенте плотности сахаразы (1- фракция «сахарных» вакуолей, 2 - фракция «солевых» вакуолей). В - те же фракции под световым микроскопом. С - поперечный срез корнеплода столовой свеклы. Кольцевая паренхима содержит «сахарные» вакуоли, межкольцевая паренхима – «солевые». Фото Прадедовой Е.В.

Инфицирование в различной степени сказывалось на активности аденилатциклазной сигнальной системы в обоих типах вакуолей: в «солевых» вакуолях она осталась практически на том же уровне, что и в вакуолях из неинфицированных тканей, но более чем в 3 раза возросла в «сахарных» вакуолях (табл.1). При этом выход цАМФ в среду инкубации значительно снизился в обоих типах органелл. Суммарный пул цАМФ (вакуолярный + в среде инкубации), по сравнению с контролем, понизился почти в два раза в обоих типах вакуолей (табл.1). Вторичные мессенджеры других сигнальных систем также вызвали неодинаковую реакцию АСС вакуолей обоих типов. Так, в «солевых» вакуолях все концентрации кальция не влияли на содержание цАМФ, а добавление пероксида водорода привело к незначительному понижению его уровня. При этом в среде инкубации «солевых» вакуолей изменение концентрации цАМФ было незначительным и соотношение уровня цАМФ в среде инкубации к вакуолярному соку мало отличалось от такового в варианте «неинфицированные» (табл.1). Интересно, что кальций во всех концентрациях снизил уровень цАМФ в «сахарных вакуолях» примерно на 50% относительно контроля, а пероксид водорода уменьшил его почти до фоновых значений. В среде инкубации также произошло снижение концентрации цАМФ, в наибольшей степени под воздействием пероксида водорода (табл.1).



Таблица 1. Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  на содержание цАМФ в вакуолях и в среде их инкубации на начальной стадии покоя (октябрь-ноябрь), а также на фоне биотического стресса.

| Варианты опыта                       | Содержание цАМФ, нмоль/мг белка |                 |                         |                    |                 |                         |
|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|
|                                      | «Солевые» вакуоли               |                 |                         | «Сахарные» вакуоли |                 |                         |
|                                      | вакуоли                         | среда инкубации | среда инкубации/вакуоли | вакуоли            | среда инкубации | среда инкубации/вакуоли |
| Начало покоя, неинфицированные ткани |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| контроль                             | 20±1                            | 120±7           | 6                       | 5±0,3              | 300±17          | 60                      |
| $\text{Ca}^{2+}$                     |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                | 50±2,8*                         | 120±7           | 2,4                     | 4±0,2              | 330±16          | 67,5                    |
| 500нМ                                | 50±2,8*                         | 228±12**        | 4,6                     | 4±0,2              | 300±17          | 67,5                    |
| 1мкМ                                 | 50±2,8*                         | 228±12**        | 4,6                     | 4±0,3              | 300±17          | 67,5                    |
| 10мкМ                                | 50±2,7*                         | 180±9**         | 3,6                     | 4±0,3              | 300±18          | 67,5                    |
| $\text{H}_2\text{O}_2$               |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                | 19±1                            | 100±6*          | 5,3                     | 4±0,2              | 210±11*         | 52,5                    |
| 350нМ                                | 20±1                            | 100±6*          | 5                       | 4±0,2              | 210±11*         | 52,5                    |
| 700нМ                                | 26±1,2*                         | 110±6*          | 4,3                     | 5±0,3              | 200±10*         | 40                      |
| 7мкМ                                 | 26±1,2*                         | 110±6*          | 4,3                     | 5±0,3              | 200±10*         | 40                      |
| Начало покоя, инфицированные ткани   |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| контроль                             | 18±0,9                          | 54±3            | 3                       | 16±0,8             | 100±6           | 6,3                     |
| $\text{Ca}^{2+}$                     |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                | 18±0,9                          | 60±3            | 3,3                     | 8±0,4*             | 80±4*           | 10                      |
| 500нМ                                | 18±0,9                          | 50±2,5          | 2,8                     | 9±0,4*             | 79±4*           | 9,8                     |
| 1мкМ                                 | 18±0,9                          | 50±2,5          | 2,8                     | 9±0,4*             | 78±4*           | 9,7                     |
| 10мкМ                                | 17±0,6                          | 50±2,6          | 2,9                     | 9±0,4*             | 79±4*           | 9,8                     |
| $\text{H}_2\text{O}_2$               |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                | 16±0,8                          | 54±2,5          | 3,4                     | 0,4±0,02**         | 2±0,1**         | 5                       |
| 500нМ                                | 13±0,6*                         | 54±2,5          | 4,2                     | 0,4±0,02**         | 2±0,1**         | 5                       |
| 1мкМ                                 | 13±0,6*                         | 54±2,5          | 4,2                     | 0,4±0,02**         | 2±0,1**         | 5                       |
| 10мкМ                                | 13±0,6*                         | 54±2,5          | 4,2                     | 0,4±0,02**         | 2±0,1**         | 5                       |

Приведены средние значения из 8 аналитических повторностей ± ошибка средней. \* $P \leq 0,01$ , \*\* $P \leq 0,001$ , сравнение с контролем.

**В фазе глубокого покоя** были выявлены принципиальные отличия динамики концентраций цАМФ от аналогичных показателей, полученных в период начала покоя. Так, этот мессенджер почти весь находился в «солевых» вакуолях, тогда как в «сахарных» цАМФ присутствовал в меньших количествах, чем во вневакуолярном пространстве (табл. 2). Кроме того, на данной стадии покоя уровень цАМФ под воздействием всех испытанных концентраций кальция и пероксида водорода не изменялся в вакуолях обоих типов, но резко возрастал в среде инкубации (табл. 2).

Инфицирование не столь значительно отразилось на изменении содержания цАМФ в обоих типах вакуолей на данной фазе покоя. В «солевых вакуолях» в контроле и под воздействием различных концентраций кальция и пероксида водорода его уровни практически не изменились, также как и в «сахарных» вакуолях (табл.2). При этом обращает на себя внимание изменение количества цАМФ в среде инкубации: у «солевых» вакуолей наблюдалось резкое его возрастание при малых концентрациях кальция и пероксида водорода и существенное снижение уровня по мере возрастания концентраций этих агентов (табл. 2).

Таблица 2. Влияние  $Ca^{2+}$  и  $H_2O_2$  на содержание цАМФ в вакуолях и в среде их инкубации на стадии глубокого покоя (февраль-март), а также на фоне биотического стресса

| Варианты опыта                          | Содержание цАМФ, нмоль/мг белка |                 |                         |                    |                 |                         |
|---|---------------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|
|   | «Солевые» вакуоли               |                 |                         | «Сахарные» вакуоли |                 |                         |
|   | вакуоли                         | среда инкубации | среда инкубации/вакуоли | вакуоли            | среда инкубации | среда инкубации/вакуоли |
| Начало покоя: а) неинфицированные ткани |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| контроль                                | 250 ±13                         | 3±0,14          | 0,01                    | 141±12             | 248±11          | 1,8                     |
| $Ca^{2+}$                               |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                   | 253±13*                         | 250±12***       | 1,0                     | 141±12             | 248±11          | 1,8                     |
| 500нМ                                   | 251±12                          | 225±11***       | 0,9                     | 143±12             | 250±12*         | 1,7                     |
| 1мкМ                                    | 250±13                          | 75±4***         | 0,3                     | 143±12             | 253±12*         | 1,8                     |
| 10мкМ                                   | 248±12                          | 75±5***         | 0,3                     | 143±12             | 255±13**        | 1,8                     |
| $H_2O_2$                                |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                   | 250±12                          | 75±4***         | 0,3                     | 142±11             | 251±11*         | 1,8                     |
| 350нМ                                   | 252±14                          | 125±7***        | 0,5                     | 143±12             | 252±11*         | 1,8                     |
| 700нМ                                   | 254±14*                         | 250±12***       | 0,9                     | 143±12             | 251±11*         | 1,8                     |
| 7мкМ                                    | 253±13*                         | 250±12***       | 0,9                     | 143±11             | 250±11*         | 1,7                     |
| б) инфицированные ткани                 |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| контроль                                | 250±12                          | 25±1,1          | 0,1                     | 168±8              | 0,3±0,01        | 0,001                   |
| $Ca^{2+}$                               |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                   | 252±13                          | 225±12***       | 0,9                     | 167±9              | 0,3±0,01        | 0,002                   |
| 500нМ                                   | 252±12                          | 225±7***        | 0,9                     | 167±9              | 0,3±0,01        | 0,002                   |
| 1мкМ                                    | 253±13*                         | 75±5**          | 0,3                     | 167±9              | 0,3±0,01        | 0,002                   |
| 10мкМ                                   | 254±13*                         | 75±5**          | 0,3                     | 167±9              | 0,2±0,01        | 0,002                   |
| $H_2O_2$                                |                                 |                 |                         |                    |                 |                         |
| 100нМ                                   | 251±12                          | 75±5**          | 0,3                     | 167±8              | 0,2±0,01        | 0,001                   |
| 500нМ                                   | 251±12                          | 7±0,3***        | 0,02                    | 167±8              | 0,2±0,01        | 0,001                   |
| 1мкМ                                    | 251±12                          | 8±0,6***        | 0,03                    | 167±7              | 0,2±0,01        | 0,001                   |
| 10мкМ                                   | 252±12                          | 5±0,2***        | 0,01                    | 167±8              | 0,3±0,01        | 0,001                   |

Приведены средние значения из 8 аналитических повторностей ± ошибка средней. \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ , сравнение с контролем.

Напротив, в среде «сахарных» вакуолей уровень цАМФ понижался уже в контроле практически в 1000 раз относительно «неинфицированных» и вторичные мессенджеры других сигнальных систем на его содержание не влияли (табл. 1, 2). Суммарный пул цАМФ, также как и соотношение вневакуолярного цАМФ к внутривакуолярному, существенно снизился только в «сахарных» вакуолях.

Ранее работами некоторых авторов было установлено, что в различных органеллах растительных клеток функционирует аденилатциклазная сигнальная система. В частности, она была обнаружена в ядрах и хлоропластах (Ломоватская и др., 2010; Witters et al., 2004, 2005).

Показанное нами присутствие цАМФ в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы свидетельствует о том, что данные органеллы активно участвуют в трансдукции и преобразовании внутриклеточных сигналов. Об этом можно судить по динамике изменения соотношения концентраций цАМФ в вакуолях и среде инкубации в различные периоды покоя (табл. 1, 2). По-видимому, в фазе начала покоя, несмотря на замирание метаболических процессов, сохраняется определенная функциональная активность ключевых ферментов сигнальных систем, в частности, аденилатциклазной. При этом большая часть цАМФ в качестве сигнальной молекулы переносится из вакуолей обоих типов через тонопласт в цитозоль, где при отсутствии необходимости в трансдукции сигнала, может элиминироваться, например, с участием фосфодиэстеразы (ФДЭ). Напротив, в период максимального (глубокого) покоя корнеплода основной пул цАМФ сосредоточен в вакуолях (в «сахарных» вакуолях в меньшей степени, чем во вневакуолярной среде). Возможно, это связано с тем, что в конце данного периода «спящие» метаболические процессы в клетках корнеплодов начинают пробуждаться, поэтому для подготовки к запуску трансдукции сигнала требуется синтез этой сигнальной молекулы. Вероятно, в качестве переносчиков цАМФ могут выступать присутствующие на тонопласте  $Ca^{2+}$ -регулируемые АВС-транспортёры, имеющие сайт связывания с нуклеотидами (Орлов, Максимова, 1999).

Весьма интересно влияние экзогенных  $Ca^{2+}$  и  $H_2O_2$  на активность АСС вакуолей. В большей степени модулирующий эффект оказывали ионы кальция, чем пероксида водорода и реакция этой системы, локализованной в «солевых» вакуолях была более интенсивной, но только в период начала покоя (табл. 1); в фазе глубокого покоя влияние кальция сводилось к увеличению пула вневакуолярного цАМФ только в «солевых» вакуолях (табл. 2).

Можно отметить еще одну тенденцию – в начале покоя, независимо от воздействия кальцием или пероксидом водорода, содержание цАМФ внутри «солевых» вакуолей было явно ниже по сравнению с таковым во вневакуолярном пространстве. Напротив, в «сахарных» вакуолях уровень цАМФ был предельно мал, но зато весьма высок во вневакуолярном пространстве (табл. 1). С учетом почти полного отсутствия в «сахарных» вакуолях активности рАЦ

(рис. 3), вероятно, синтез цАМФ в таких органеллах мог происходить только за счет активности тАЦ (рис. 4), причем, практически весь пул этого мессенджера тут же выводился за пределы тонопласта (табл. 1).

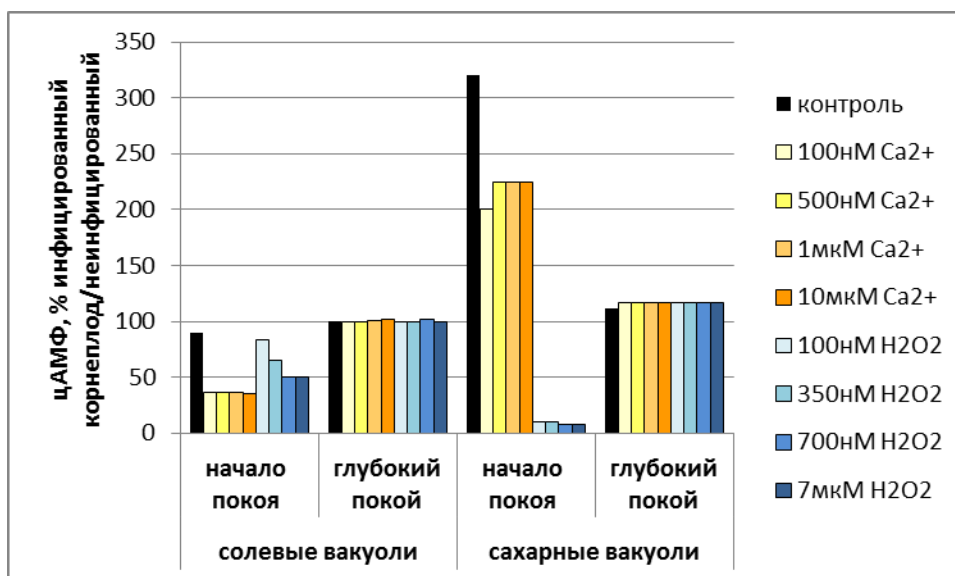


Рис. 2. Изменение относительных уровней цАМФ под влиянием инфицирования, ионов кальция и пероксида водорода в вакуолях клеток корнеплода столовой свеклы на различных этапах покоя.

Совершенно иначе выглядит реакция АСС вакуолей на долговременный биотический стресс (заражение фитопатогенным грибом *Botritis cinerea*). В этом случае, на стадии начала покоя, уровень цАМФ по сравнению с контролем (неинфицированные ткани) менялся значительно и разнонаправлено в обоих типах вакуолей (91% «солевые», 338% - «сахарные» вакуоли), тогда как в глубоком покое в «солевых» и «сахарных» вакуолях уровень цАМФ был на уровне контроля (рис. 2).

Можно утверждать, что метаболиты грибного фитопатогена на активность аденилатциклазной сигнальной системы влияли опосредованно, поскольку в экспериментах использовали ткань корнеплода, свободную от гифов гриба.

## 2. Активности растворимой и тонопластной аденилатциклаз на стадии начала покоя корнеплода.

**Активность рАЦ, неинфицированные ткани.** В вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы была выявлена активность двух форм аденилатциклазы (АЦ): локализованной в тонопласте и являющейся аналогом мембраносвязанной формы фермента (тАЦ), и растворимой (рАЦ). Подтверждения тому, что исследуемые ферменты принадлежат к вышеуказанным формам аденилатциклаз, были получены при применении специфического ингибитора и активаторов аденилатциклаз. В качестве ингибитора тАЦ использовали 10 мкМ сурамина, специфически подавляющего активности мембраносвязанных АЦ (Ло-

моватская и др., 2010) за счет прерывания связи G-белков с лигандом. В нашем случае ингибирование этим агентом активности тАЦ составляло 90-93%. В качестве активаторов для тАЦ использовали 10мМ NaF, специфически взаимодействующий с G-белком. Стимуляция тАЦ фторидом натрия составляла 50-60%. Для вакуолярной рАЦ была выявлена существенная (в 1,5 раза) активация ионами  $Mn^{+2}$ , и незначительная (в 1,2 раза) стимуляция  $Mg^{+2}$ , что также характерно для растворимой формы фермента (Kamenetsky, 2006).

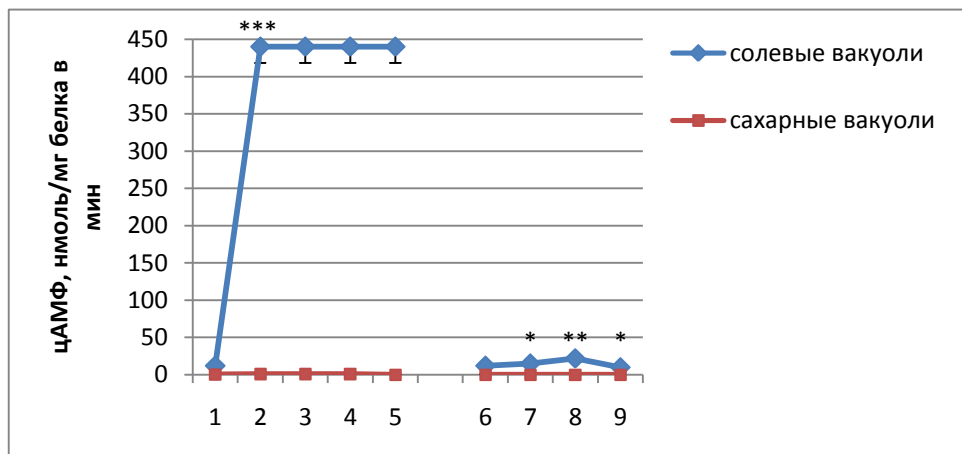


Рис. 3. Изменение активности рАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях, выделенных из клеток неинфицированных тканей столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода, период начала покоя (октябрь-ноябрь). 1 – Контроль; 2 – 100нМ Ca<sup>2+</sup>; 3 – 500нМ Ca<sup>2+</sup>; 4 – 1мкМ Ca<sup>2+</sup>; 5 – 10мкМ Ca<sup>2+</sup>; 6 – 100нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 7 – 350нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 8 – 700нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 9 – 7мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Здесь и на Рис. 4-10 приведены средние значения из 8 аналитических повторностей. \* P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001 (для вариантов 2,3,4,5 в солевых вакуолях), сравнение с контролем.

Прежде всего, следует отметить, что в начальный период покоя исходные (базовые) уровни активностей рАЦ в обоих типах вакуолей были небольшими, но сравнительно более высокая ее активность наблюдалась в «солевых» вакуолях (рис. 3), что согласуется с повышенным уровнем цАМФ в них (Табл. 1). Однако, под влиянием даже небольшой концентрации кальция (100 нМ) активность рАЦ в «солевых» вакуолях резко возросла – в сотни раз. Напротив, в «сахарных» вакуолях активность рАЦ почти не менялась. Пероксид водорода практически не оказывал никакого влияния на рАЦ из обоих типов вакуолей (рис. 3).

**Активность тАЦ, неинфицированные ткани.** Обращает на себя внимание то, что, во-первых, исходные активности тАЦ в обоих типах вакуолей в начальный период покоя были гораздо выше относительно таковых рАЦ (в 12 раз у «солевых» и в 188 раз у «сахарных», соответственно, рис. 3, 4) и, во-вторых, уровень активности тАЦ «солевых» вакуолей в 1,4 раза превосходил активность тАЦ «сахарных» вакуолей (рис.4). Характер влияния различных концентраций кальция существенно отличался в двух типах вакуолей: в «со-

левых» вакуолях он описывался классической колоколообразной кривой, из которой следует, что максимальный активирующий эффект кальций оказывал в концентрации 100 нМ. В то же время для тАЦ из «сахарных» вакуолей все испытанные концентрации данного катиона оказались неэффективными (рис.4). Что касается пероксида водорода, то его концентрации в пределах 100-700 нМ на активность тАЦ из «солевых» вакуолей не влияли, а 7 мкМ ингибировали. Для тАЦ из «сахарных» вакуолей, судя по графику, активирующими должны быть концентрации пероксида водорода менее 100нМ. Интересно, что в этом случае даже самый высокий уровень  $H_2O_2$  снижал ее активность только до уровня контроля (рис.4).

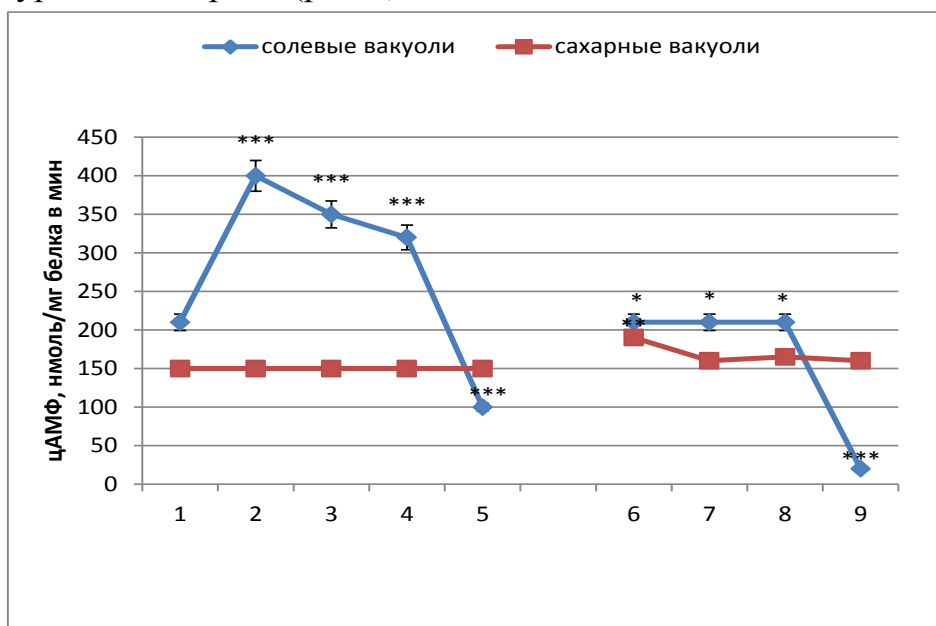


Рис. 4. Изменение активности тАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях, выделенных из клеток неинфицированных тканей корнеплода столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода, период начала покоя. **1** – Контроль; **2** – 100нМ  $Ca^{2+}$ ; **3** – 500нМ  $Ca^{2+}$ ; **4** – 1мкМ  $Ca^{2+}$ ; **5** – 10мкМ  $Ca^{2+}$ ; **6** – 100нМ  $H_2O_2$ ; **7** – 350нМ  $H_2O_2$ ; **8** – 700нМ  $H_2O_2$ ; **9** – 7мкМ  $H_2O_2$ . \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , сравнение с контролем.

**Активность рАЦ, инфицированные ткани.** При длительном инфицировании корнеплода в «солевых» вакуолях исходная активность рАЦ практически не менялась по сравнению с вариантом «неинфицированные корнеплоды». Все экзогенные концентрации кальция, как и пероксида водорода в диапазоне концентраций 100-700 нМ, не оказывали на неё никакого эффекта; только 7 мкМ  $H_2O_2$  несколько повышал активность рАЦ (рис. 5). В «сахарных» вакуолях, напротив, весьма слабая исходная активность рАЦ возрастала в 2 раза (0,8 нМ цАМФ/мг белка в мин в контроле – см. Рис. 3, и 1,5 нМ цАМФ/мг белка в мин при инфицировании). Все концентрации  $Ca^{2+}$  и  $H_2O_2$  практически не оказывали воздействия на изменение ее активности (рис. 5).

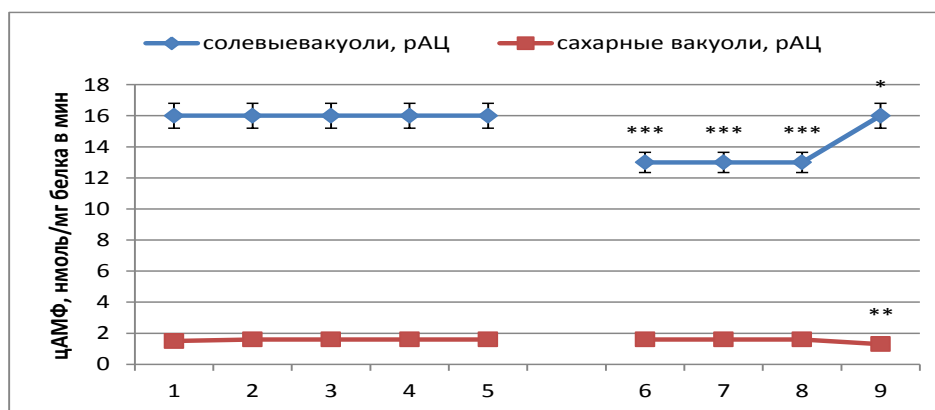


Рис. 5. Изменение активности рАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях клеток корнеплода столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода на фоне инфицирования корнеплода *Botrytis cinerea*, период начала покоя. **1** – Контроль; **2** – 100нМ Ca<sup>2+</sup>; **3** – 500нМ Ca<sup>2+</sup>; **4** – 1мкМ Ca<sup>2+</sup>; **5** – 10мкМ Ca<sup>2+</sup>; **6** – 100нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **7** – 350нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **8** – 700нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **9** – 7мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001, сравнение с контролем.

**Активность тАЦ, инфицированные ткани.** В начальный период покоя исходные активности тАЦ как «солевых», так и «сахарных» вакуолей в условиях инфицирования были гораздо ниже относительно таковых в варианте без инфицирования (в 3 и 4,5 раз соответственно, рис. 4, б). В «солевых» вакуолях кальций в диапазоне от 100 нМ до 1мкМ несколько повышал активность тАЦ, а пероксид водорода незначительный активирующий эффект проявлял в концентрации 700 нМ (рис. б). В «сахарных» вакуолях оба экзогенных агента (кальций и пероксид водорода) на активность тАЦ оказывали несущественное модулирующее влияние (рис. б).

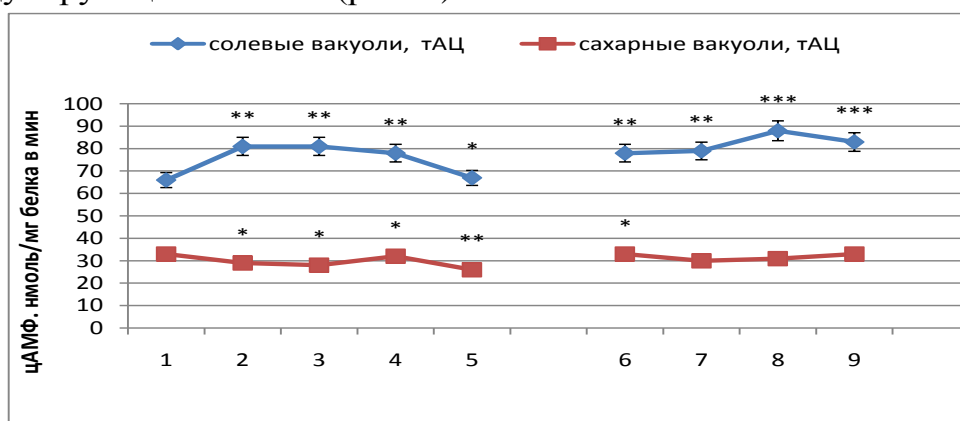


Рис. 6. Изменение активности тАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях клеток корнеплода столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода на фоне инфицирования корнеплода *Botrytis cinerea*, период начала покоя. **1** – Контроль; **2** – 100нМ Ca<sup>2+</sup>; **3** – 500нМ Ca<sup>2+</sup>; **4** – 1мкМ Ca<sup>2+</sup>; **5** – 10мкМ Ca<sup>2+</sup>; **6** – 100нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **7** – 350нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **8** – 700нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **9** – 7мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001, сравнение с контролем.

### 3. Активности растворимой и тонопластной аденилатциклаз на стадии глубокого покоя корнеплода.

**Активность рАЦ, неинфицированные ткани.** В период глубокого покоя базовые активности рАЦ остались на низком уровне, и как в начальном периоде покоя, активность фермента в «солевых» вакуолях была несколько выше (рис.7).

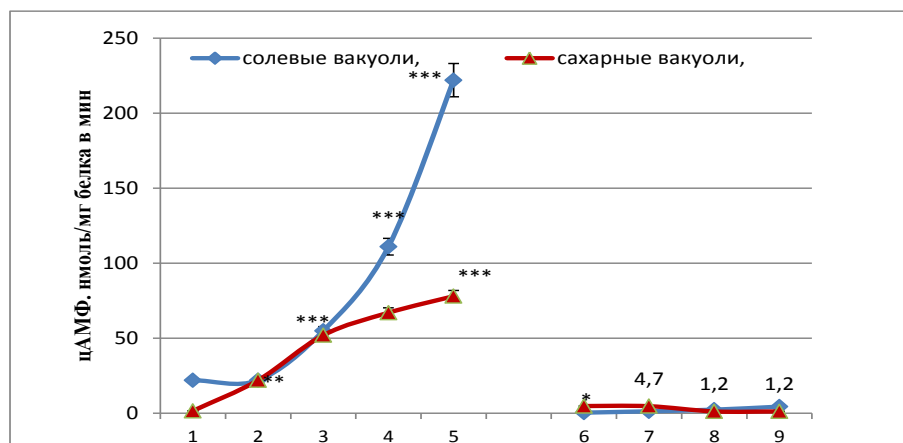


Рис.7. Изменение активности рАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях клеток столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода, период глубокого покоя (февраль-март).

1 – Контроль; 2 – 100нМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; 3 – 500нМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; 4 – 1мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; 5 – 10мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; 6 – 100нМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 7 – 350нМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 8 – 700нМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 9 – 7мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

\*  $P \leq 0,05$  (для варианта 6 в сахарных вакуолях); \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , сравнение с контролем.

Ионы кальция стимулировали ее активность концентрационнозависимо: судя по графику, 10 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  оказывал сильный стимулирующий эффект на рАЦ в обоих типах вакуолей, хотя в «сахарных» вакуолях интенсивность этого процесса была ниже. Напротив, пероксид водорода почти не влиял на ее активность в обоих типах вакуолей (рис. 7).

**Активность тАЦ, неинфицированные ткани.** В фазе глубокого покоя значительно возросли исходные уровни активности тАЦ в обоих типах вакуолей относительно начальной фазы покоя, в особенности (в 157 раз) опять же в «солевых» вакуолях (рис. 8). Это согласуется с данными по уровню цАМФ в вакуолях в этот период, где он также возрастал (табл.1, 2). В этих условиях на тАЦ из «солевых» вакуолей ионы кальция оказывали стимулирующее влияние начиная с концентрации 1 мкМ: 10 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  были наиболее эффективны (стимуляция активности в 10 раз), но судя по тренду кривой, это не предел и действие более высоких концентраций должно быть выражено еще ярче. В то же время пероксид водорода почти не оказывал влияния на активность тАЦ «солевых» вакуолей (рис. 8). Интересно, что в «сахарных» вакуолях кальций в используемых концентрациях не влиял на активность тАЦ, тогда как пероксид водорода существенно (в 8 раз) снижал ее активность (рис. 8).



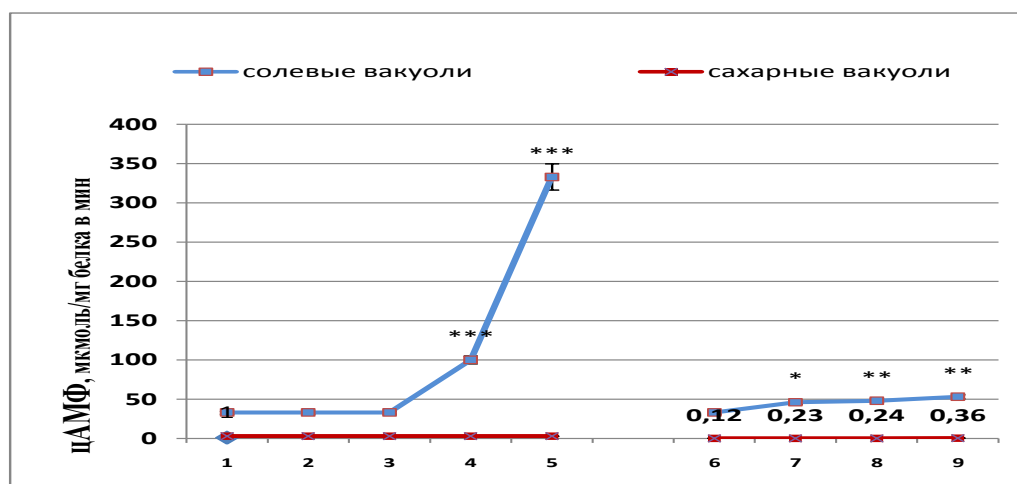


Рис.8. Изменение активности тАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях клеток столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода, период глубокого покоя.

1 – Контроль; 2 – 100нМ Ca<sup>2+</sup>; 3 – 500нМ Ca<sup>2+</sup>; 4 – 1мкМ Ca<sup>2+</sup>; 5 – 10мкМ Ca<sup>2+</sup>; 6 – 100нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 7 – 350нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 8 – 700нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 9 – 7мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

\* P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001, сравнение с контролем.

**Активность рАЦ, инфицированные ткани.** Инфицирование весьма незначительно повлияло на активность рАЦ в обоих типах вакуолей, но при этом чувствительность к кальцию этой формы фермента из «солевых» вакуолей изменилась: максимальный стимулирующий эффект на активность фермента оказывал 500 нМ Ca<sup>2+</sup> (рис. 9). В «сахарных» вакуолях активирующее влияние кальция на рАЦ было выражено заметно слабее. При этом общая картина Ca<sup>2+</sup>-зависимой кинетики активности фермента почти полностью соответствовала таковой в варианте «неинфицированные корнеплоды» (рис. 7, 9). Пероксид водорода в диапазоне испытанных концентраций преимущественно угнетал активность рАЦ в обоих типах вакуолей.

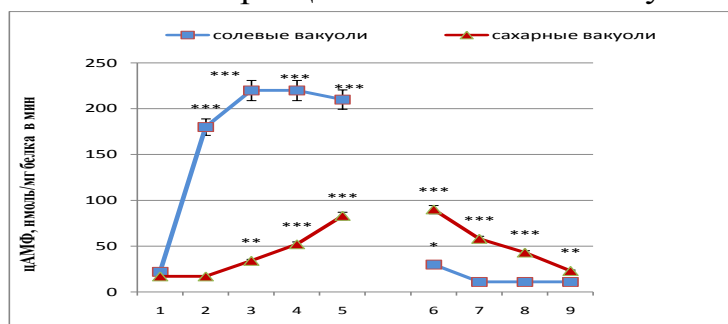


Рис. 9. Изменение активности рАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях клеток корнеплода столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода на фоне инфицирования корнеплода *Botritis cinerea*, период глубокого покоя. 1 – Контроль; 2 – 100нМ Ca<sup>2+</sup>; 3 – 500нМ Ca<sup>2+</sup>; 4 – 1мкМ Ca<sup>2+</sup>; 5 – 10мкМ Ca<sup>2+</sup>; 6 – 100нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 7 – 350нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 8 – 700нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 9 – 7мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

\* P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,01; \*\*\* P ≤ 0,001, сравнение с контролем.

Однако, для рАЦ из «сахарных» вакуолей проявлялся активирующий эффект  $H_2O_2$  при минимальной концентрации 100 нМ (стимуляция активности в 5 раз, рис.9). Судя по тренду кинетики, концентрации пероксида водорода менее 100 нМ должны стимулировать активность рАЦ в большей степени.

**Активность тАЦ, инфицированные ткани.** Инфицирование корнеплода в стадии глубокого покоя существенно ингибировало активность тАЦ из вакуолей «солевого» типа (рис. 10). Кальций в различной степени, но активировал эту форму фермента в обоих типах вакуолей. Интересно, что для тАЦ «сахарных» вакуолей максимальный активирующий эффект оказала более низкая концентрация кальция, чем для «солевых», где, судя по графику, максимум активности еще не достигнут. Пероксид водорода в «солевых» вакуолях проявлял явный активирующий эффект, достигающий максимума при концентрации 700 нМ (рис. 10). В то же время в «сахарных» вакуолях, начиная с концентрации 350 нМ,  $H_2O_2$  наблюдалось подавляющее его действие, характеризующееся нисходящей ветвью кривой, отражающей кинетику ферментативной реакции. Это указывает на то, что концентрации пероксида водорода, необходимые для активации этой формы фермента в «сахарных» вакуолях, должны лежать в пределах, не превышающих 100 нМ (рис. 10).

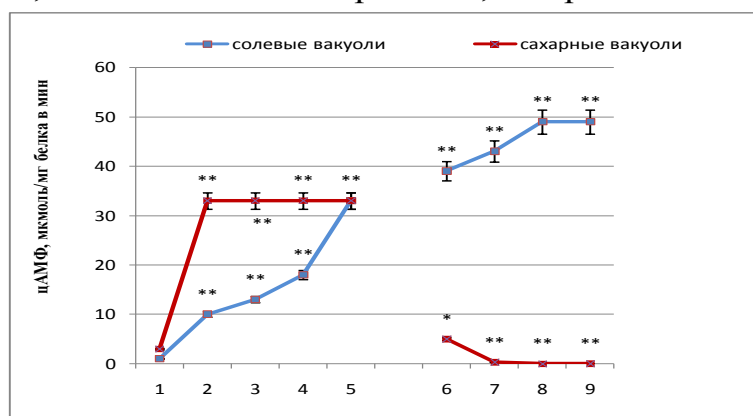


Рис. 10. Изменение активности тАЦ в «солевых» и «сахарных» вакуолях клеток корнеплода столовой свеклы под влиянием различных концентраций ионов кальция и пероксида водорода на фоне инфицирования корнеплода *Botritis cinerea*, период глубокого покоя. 1 – Контроль; 2 – 100нМ  $Ca^{2+}$ ; 3 – 500нМ  $Ca^{2+}$ ; 4 – 1мкМ  $Ca^{2+}$ ; 5 – 10мкМ  $Ca^{2+}$ ; 6 – 100нМ  $H_2O_2$ ; 7 – 350нМ  $H_2O_2$ ; 8 – 700нМ  $H_2O_2$ ; 9 – 7мкМ  $H_2O_2$ . \*  $P \leq 0,01$ ; \*\*  $P \leq 0,001$ , сравнение с контролем.

Из представленных в этом разделе результатов можно сделать следующие выводы:

1) Во всех исследуемых периодах покоя более высокая активность рАЦ и тАЦ наблюдалась в «солевых» вакуолях.

2) В начале покоя неинфицированных корнеплодов кальций в большей степени, чем пероксид водорода оказывал модулирующий (при малых концентрациях стимулирующий) эффект на эти формы фермента в «солевых» вакуолях и почти не влиял на рАЦ и тАЦ «сахарных» вакуолей.

3) Инфицирование фитопатогенным грибом *Botrytis cinerea* в период начала покоя ингибировало активность тАЦ, но не рАЦ в обоих типах вакуолей. В «сахарных» вакуолях наблюдалась незначительная стимуляция рАЦ, обладающей весьма слабой исходной активностью. При этом на активность тАЦ кальций и пероксид водорода оказывали разнонаправленное действие, а рАЦ к этим агентам в обоих типах вакуолей была почти не чувствительной.

4) Инфицирование в период глубокого покоя заметно повышало слабую исходную активность рАЦ «сахарных» вакуолей и сильно ингибировало активность тАЦ «солевых» вакуолей. На активность рАЦ «солевых» и тАЦ «сахарных» вакуолей инфицирование никакого влияния не оказывало. В «сахарных» вакуолях наблюдалась сильная, более чем в 10 раз, активация тАЦ под воздействием ионов кальция и пероксида в отличие от варианта «неинфицированные ткани». На активность рАЦ в обоих типах вакуолей пероксид водорода оказывал более существенное стимулирующее влияние, чем кальций.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Для корнеплодов свеклы, как для покоящихся органов, характерны несколько стадий покоя: начала, глубокого покоя и выхода из него. Регуляция глубины состояния покоя в основном осуществляется с помощью фитогормонов, уровень и качественный состав которых индивидуален для каждой стадии (Ладыженская, Проценко, 2002; Озолина и др., 2005). К числу агентов, способствующих выходу из покоя, относят и экзометаболиты фитопатогенных микроорганизмов, например, элиситоров грибов. Биохимические процессы, происходящие на плазмалемме при регуляции гормонами состояния покоя и действии элиситоров, имеют много общего (Ладыженская, Проценко, 2002). Наиболее ранними реакциями растительной клетки в этом случае является изменение транспорта ионов и величины трансмембранного потенциала плазмалеммы (Медведев, 2005). Благодаря этому в любом органе растения по сосудистой системе распространяется системный сигнал, представляющий собой потенциал действия (ПД), связывающий этап рецепции с эффекторным ответом растений (Arazi, 2001).

По литературным данным, активность мембраносвязанной аденилатциклазы активируется как экзогенными фитогормонами, так и экзометаболитами фитопатогенов, в частности, элиситорами (Ichikawa et al., 1997; Kurosaki et al., 1997), которые могут конкурировать за сайты связывания (рецепторы) на клеточной мембране (Ладыженская Проценко, 2002). При этом, каждой фазе состояния покоя корнеплода соответствует индивидуальное соотношение фитогормонов, присутствующих в апопласте (Ладыженская, Проценко, 2002; Озолина и др., 2005). Все это вместе взятое кардинальным образом способно пре-

образовывать активность ферментов, локализованных в плазмалемме, в том числе мембраносвязанной аденилатциклазы. Таким образом, в клетке, в ответ на раздражение, формируется определенный пул сигнальных молекул, в частности, цАМФ, который запускает каскад сигналов, декодирующих внешний импульс в адекватные внутриклеточные ответные реакции.

Если компоненты различных сигнальных систем, локализованные в плазмалемме, более или менее хорошо охарактеризованы (Тарчевский, 2001), то активность присутствующих во внутриклеточных компартментах сигнальных каскадов изучена явно недостаточно. Трудность в интерпретации результатов заключается еще и в том, что органеллы, кроме опосредованного влияния факторов внешней среды, испытывают и воздействие внутриклеточных компонентов, тех же фитогормонов, концентрация и состав которых также варьируют в различные периоды роста и покоя растений. Поэтому внутриклеточный сигнал является интегральным, включающим взаимодействие многих компонентов разных сигнальных систем и регуляторных факторов белковой и гормональной природы. Существенные коррективы в такую картину внутриклеточной трансдукции сигналов вносят и внешние факторы, в нашем случае, экзозометаболиты грибного патогена, хотя их воздействие, как уже отмечалось, имеет опосредованный характер. Кроме того, вакуоль, занимающая в клетке до 90% ее объема, содержит компоненты про- и антиоксидантной защиты, активируемые вторичными мессенджерами кальциевые ионные каналы, что подтверждает существенную роль этого компартмента в регуляции метаболизма клетки (Прадедова, 2009; Андреев, 2012; Reiter, 2011). Поэтому весьма важно рассмотрение механизмов модуляции активности АСС, в частности, в вакуолях и на тонопласте.

Исследования показали, что, несмотря на отличающиеся абсолютные значения концентрации цАМФ в вакуолях, можно выделить ряд общих тенденций. Так, ионы кальция в большей степени, чем пероксид водорода, влияли на активность компонентов АСС в обоих типах вакуолей, причем, было более ярко выражено в период глубокого покоя. Инфицирование грибным патогеном существенно подавляло активность АСС; в «солевых» вакуолях экзогенные кальций и пероксид водорода активировали только тАЦ, но в меньшей степени, чем это наблюдалось для этой формы АЦ из неинфицированных тканей. В то же время в «сахарных» вакуолях инфицирование оказывало существенное активирующее воздействие на рАЦ и тАЦ, но только в присутствии вторичных мессенджеров, и только при глубоком покое.

Это еще раз подтверждает, что «солевые» и «сахарные» вакуоли имеют серьезные качественные отличия в структуре компонентов АСС, скорее всего связанные с функциональными задачами каждого типа этих органелл. Представляет интерес рассмотреть возможные функции цАМФ в вакуолях. Анализ литературных данных позволяет предположить, что данный вторичный мессенджер может регулировать углеводный обмен путем активации ключевых ферментов в растительных клетках (Выскребенцева, Иванов, 1982), и, в част-

ности в вакуолях (Озолина и др., 2005; Прадедова и др., 2009). Здесь уместно упомянуть, что и другие ферменты, встроенные в тонопласт, меняют свою активность на разных этапах онтогенеза под воздействием различных фитогормонов (Озолина и др., 1996; Прадедова и др., 1999). Есть также сведения, что модуляция активности  $K^+$  каналов клеток растений осуществляется с участием цАМФ и кальция (Li et al., 1994; Kurosaki, 1997).

Можно полагать, что механизм воздействия вторичных мессенджеров (ионов кальция и пероксида водорода) на аденилатциклазы, различен. По данным, полученным для клеток животных, ионы кальция влияют на кинетические параметры аденилатциклаз (Kamenetsky et al., 2006), модулируя степень связывания фермента с субстратом. Проведенные нами ранее исследования активности аденилатциклаз растений дают основания предполагать существование такого же механизма регуляции и у растений (Ломоватская и др., 2010).

Известно, что пероксид водорода, являясь сигнальной молекулой (Креславский и др., 2012; Ткачук и др., 2012), не только сам подвергается влиянию компонентами других сигнальных систем, но также способен изменять их уровень и активность. Так, есть данные, что, с одной стороны, повышение концентрации кальция и цАМФ приводило к возрастанию в цитозоле уровня пероксида водорода (Максимов и др., 2010) а, с другой стороны, повышенная концентрация  $H_2O_2$  стимулировала активность кальциевых каналов (Pei et al., 2000).

Проведенные исследования позволяют заключить, что физиологическое состояние и поддержание метаболизма на необходимом уровне клеток корнеплода столовой свеклы во многом определяются активностью сигнальных систем, присутствующих в вакуолях. Это следует из анализа результатов по динамике концентраций внутри- и вневакуолярного цАМФ. Так, если в начальной фазе покоя подавляющая часть цАМФ находится за пределами вакуолей обоих типов, то в состоянии глубокого покоя уровень внутривакуолярного цАМФ значительно возрастает, а выход во вневакуолярное пространство сокращается до минимума, но только в вакуолях «солевого» статуса. Тем самым это может быть одной из причин предотвращения в глубоком покое: а) запуска несвоевременной активации синтетических процессов в цитоплазме клеток межпучковой паренхимы, содержащих такие вакуоли; б) опосредуемого через  $H^+$ -АТФазы и  $H^+$ -пирофосфатазы тонопласта транспорта сахаров из клеток с «сахарными» вакуолями, поскольку есть сведения об ингибировании этих ферментов экзогенным цАМФ (Прадедова и др., 2006). Наши и литературные данные еще раз подтверждают специфические функции каждого типа вакуолей, выполняемые в клетках, принадлежащих к различным тканям корнеплода свеклы. Частичное моделирование в наших экспериментах подготовки клеток к выходу из глубокого покоя (варьирование концентраций вторичных мессенджеров - кальция, пероксида водорода) выявило как существенные изменения в активности вакуолярных ключевых ферментов аденилатциклазного сигнала – рАЦ и тАЦ, так и ощутимые различия в содержании цАМФ, конечное

количество которого определяется скоординированным функционированием аденилатциклаз и фосфодиэстераз. Впрочем, присутствие последних в вакуолях растительных клеток еще предстоит доказать.

Таким образом, проведенный комплекс исследований позволяет прийти к заключению, что вакуоли растительных клеток являются компартментом, содержащим компоненты сигнальных систем, в частности, аденилатциклазной. Центральная вакуоль растительной клетки, депонируя активные молекулы, в том числе вторичные мессенджеры, выполняет роль модулятора внутриклеточных сигнальных каскадов растений.

#### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в вакуолях клеток паренхимы столовой свеклы функционирует аденилатциклазная сигнальная система, поскольку в этих органеллах присутствуют ключевые компоненты этой системы: две формы аденилатциклазы – тонопластная (тАЦ), растворимая (рАЦ), а также продукт их реакции - цАМФ, выполняющий роль вторичного мессенджера.
2. Соотношение уровней цАМФ в вакуолях двух типов: «солевых» и «сахарных» и во вневакуолярном пространстве значительно отличалось в различные периоды покоя: в начале покоя уровень этой молекулы во вневакуолярном пространстве преобладал над внутривакуолярным, тогда как в глубоком покое основной пул этой сигнальной молекулы был сосредоточен в вакуолях.
3. Вакуоли на всех этапах покоя отличались по уровню активности аденилатциклазной сигнальной системы: более высокая концентрация цАМФ, активности рАЦ и тАЦ наблюдались в «солевых» вакуолях.
4. Ионы кальция в различных концентрациях оказывали более сильный эффект на активность исследуемых компонентов аденилатциклазной сигнальной системы, чем пероксид водорода.
5. В период глубокого покоя активность тАЦ обоих типов вакуолей значительно возрастала (max 300 мкмоль/мг белка в мин) по сравнению с периодом начала покоя (max 90 нмоль/мг белка в мин).
6. Инфицирование *Botritis cinerea* модулировало активность АСС вакуолей: в начальный период покоя ингибировало тАЦ и почти не влияло на рАЦ в обоих типах вакуолей. При глубоком покое инфицирование подавляло тАЦ в «солевых» и стимулировало активность рАЦ в «сахарных» вакуолях.
7. При инфицировании степень активации тАЦ и рАЦ экзогенными ионами кальция и пероксидом водорода существенно снижалась на разных фазах покоя. Исключение составляло повышение активности обеих форм АЦ в «сахарных» вакуолях при глубоком покое.
8. Центральная вакуоль растительной клетки участвует в трансдукции и преобразовании внутриклеточных сигналов.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Рыкун О.В., Ишеева О.Д. Влияние различных концентраций кальция и перекиси водорода на содержание цАМФ во фракциях «тяжелых» и «легких» вакуолей красной столовой свеклы // 14 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых: Биология - наука 21 века. Сборник тезисов. – Пушино, 2010. - Т.2. - С.333-334.

2. Рыкун О.В., Ишеева О.Д. Активность аденилатциклазной сигнальной системы клеток корнеплодов красной столовой свеклы в стрессовых условиях // Материалы IV Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов. – Воронеж - 2011. – Т.2. - С.145-147.

3. Ломоватская Л.А., Романенко А. С., Филинова Н. В., Рыкун О.В. Аденилатциклазная сигнальная система растений // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия: Биология. - 2011. Вып. 2 (23). - С. 6-25.

4. Lomovatskaya L.A., Romanenko A. S., Filinova N. V. and Rykun O.V. A Modified Enzyme Immunoassay Method for Determination of cAMP in Plant Cells. In: Trends in Immunolabelled and Related Techniques. Chapter 10. - Croatia: In Tech. - 2012. - P.161-169.

5. Рыкун О.В. Влияние биотического стресса, кальция и пероксида водорода на содержание цАМФ в вакуолях корнеплодов столовой свеклы в различные периоды покоя» // Вестник ИрГСХА. - 2013. - № 54. - С. 20-26.