

## БЫСТРЫЙ ОТВЕТ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ НА ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЫДЕЛЕНИЙ ГРИБНОГО ФИТОПАТОГЕНА *FUSARIUM CULMORUM*

А.И. Соколик, В.В. Самохина, В.С. Жаринов, Рафид Махди

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: Sokolik@bsu.by

### Введение

Известно, что фитопатогенные грибы приносят ощутимый вред в сельском хозяйстве. Такие фитопатогены, как *Fusarium culmorum* вызывают корневые гнили и разного рода опухолевые образования. В связи с этим изучение мембранного ответа и защитных реакций растительных клеток при взаимодействии с фитопатогеном является на сегодняшний день весьма необходимым для того, чтобы целенаправленно повышать устойчивость растений.

При взаимодействии с фитопатогеном растительная клетка первоначально реагирует на его присутствие посредством плазматической мембраны. Происходит первичный мембранный ответ и последующее выделение защитных веществ клетки. Также посредством взаимодействия клеточных рецепторов на плазматической мембране происходит изменение метаболизма клетки из-за влияния на некоторые гены клетки. Тем самым запускается каскад молекулярных реакций, которые с одной стороны, могут привести к апоптозу клеток и уничтожению части тканей, либо привести к приспособлению клетки к фитопатогену, активации защитных механизмов [1–3].

Известно, что одним из классов важных защитных веществ, выделяемых клетками, являются фитоалексины, которые приводят к замедлению синтеза ферментов грибного фитопатогена, замедлению его роста, а порой и его уничтожению. Так как плазматическая мембрана является первым барьером, который встречает фитопатоген на своем пути, изучение плазматического ответа и его возможной связи с выбросом фитоалексинов является важным, для понимания данного защитного процесса.

Таким образом, целью работы было исследование выделения фитоалексинов растительными клетками и их мембранной реакции в ответ на воздействие элиситорами фитопатогена.

### Методы исследования

Объектом исследования являлась петрушка листовая *Petroselinium sativum* L. Agardh, поскольку петрушка является популярным модельным тест-объектом для изучения фитоалексинов [4]. В ходе работы была установлена суспензионная культура петрушки листовой сорта «Богатырь». Материал для культивирования брали из живого листа растения петрушки, первоначально выращивался каллус, который затем переводили в суспензионную культуру. Клетки культивировались в среде Мурасиге-Скуга на протяжении четырех месяцев. Выращивание суспензионной культуры происходило в темноте при использовании электрической качалки. Для проведения экспериментов по определению изменения уровня фитоалексинов спектрофлуоресцентным методом использованы клетки 4-го пассажа.

Первичную мембранную реакцию растительных клеток на действие фитопатогена фузариум изучали с использованием широко распространенного модельного объекта в исследованиях такого рода – клеток пресноводных водорослей *Nitella flexilis*.

Применение этих клеток в исследованиях обусловлено их крупными размерами, четкой дифференцированностью структур, легкостью культивирования в лабораторных условиях. Плазматическая мембрана *Nitella flexilis*, имеет все основные транспортные системы, обнаруженные в клетках корней и листьев высших растений, в частности, транспортную систему ионов  $K^+$ , включающую наружу- и внутрь-выпрямляющие калиевые каналы,  $H^+$ -

АТФазную помпу,  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемые и неселективные катионные каналы. Данные, получаемые для ион-транспортных систем *Nitella flexilis*, можно экстраполировать на аналогичные системы высших растений [5].

Изучалась реакция растительных клеток на действие культуральной жидкости фитопатогена *Fusarium culmorum* L. Agardh, который вызывает корневые гнили у многих сельскохозяйственных культур, нанося большой ущерб продукции растениеводства. На сегодняшний день установлено, что данный грибной фитопатоген выделяет целый ряд веществ, которые могут непосредственно выступать в роли элиситоров. Можно полагать, что воздействие на клетку через мембрану (либо в совокупности с рецепторами) происходит не за счет одного элиситора, а за счет воздействия большого спектра пока не изученных веществ, входящих в продукты промежуточного обмена гриба.

Для культивирования гриба использовалась среда КГА (картофельно- глюкозно-агарная). Гриб переносился из чашек Петри, где этого культивировался на агарной среде, в колбы объемом 250 мл, содержащих жидкую КГА, которые помещали на качалку. Через две недели готовая культуральная жидкость отфильтровывалась от спор и остатков агара. Далее полученный раствор и центрифугировался на центрифуге при 8500 g в течении 15 мин. и отбиралась надосадочная жидкость, которая затем разливалась в пробирки по 50 мл и замораживалась.

Для регистрации изменения уровня фитоалексинов при взаимодействии культуральной жидкости гриба и суспензии петрушки был использован флуоресцентный спектрофотометр Varian Cary Eclipse.

Известно, что фитоалексины петрушки при возбуждении светом в ультрафиолетовой области спектра могут испускать излучение в голубой области спектра. Первоначально было проведено сканирование суспензии клеток петрушки в контроле и совместно с культуральной жидкостью гриба при варьировании длин волн возбуждения от 200 до 400 нм, с шагом 10 нм. Спектры испускания фиксировали в диапазоне длин волн до 800 нм.

Так как клеточная стенка, а также плазматическая мембрана клеток может исказить регистрацию флуоресценции фитоалексинов (фитокумаринов) в данных областях, было решено после взаимодействия клеток петрушки с грибами, дезинтегрировать эти клетки ультразвуком на установке Bandelin sonopuls при частоте 1 МГц в течение 5 мин, а остатки клеточных стенок и мембран клеток отцентрифугировать на центрифуге Biofuga pico Heraeus при 16 000 g в течении 20 мин.

Для установления мембранного ответа растительной клетки использована стандартная микроэлектродная техника электрофизиологических исследований с применением методики фиксации потенциала на мембране [5]. Регистрировали изменения величины потенциала покоя и сопротивления, а также получали мгновенные вольт-амперные характеристики плазматической мембраны по отдельности для наружу- и внутрь-выпрямляющих калиевых каналов [5].

### Результаты и обсуждение

На рисунке 1 показана микрофотография клеток установленной в ходе выполнения работы суспензионной культуры клеток петрушки.



Рисунок 1 – Клетки суспензионной культуры петрушки листовой; получена на микроскопе с интегрированной камерой Nikon Eclipse TS 100

Известно, что фитоалексины петрушки, (изокумарины) имеют длину волны возбуждения флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра, а испускание в синей, было решено провести анализ суспензионной культуры петрушки в диапазоне возбуждения 200–400 нм с шагом в 10 нм с целью установления оптимальной длины волны возбуждающего света. Результаты показаны на рисунке 2.

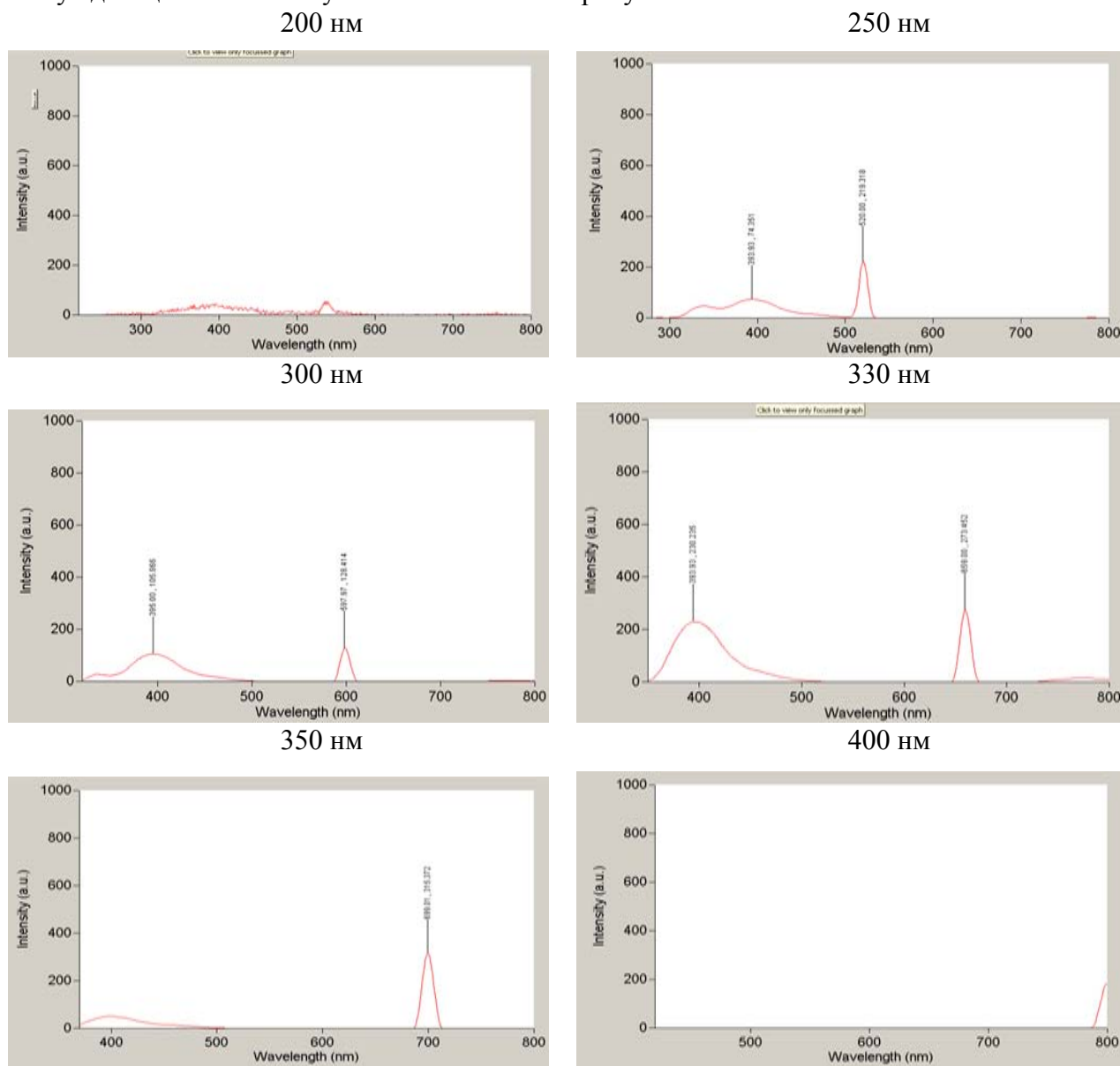


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции суспензии клеток петрушки при варьировании длины волны возбуждения от 200 до 400 нм

Как видно из приведённых данных, максимальное значение интенсивности флуоресценции в синей области спектра для суспензиальной культуры петрушки наблюдается при длине возбуждения 330 нм. Испускание происходит в диапазоне 400–420 нм, что свидетельствует не об одном определенном фитокумарине, а о спектре веществ, схожих по химическому строению и относящихся к одному классу веществ. Полученные данные свидетельствуют о том, что именно при этой длине волны возбуждения и в этом диапазоне длин волн флуоресценции можно наблюдать изменения концентрации фитокумаринов в ответ на действие грибного фитопатогена.

Для определения действия фитопатогена на уровень фитокумаринов в суспензиальную культуру петрушки культуральную жидкость грибного фитопатогена добавляли к

суспензионной культуре в соотношении 1:10; результаты флуоресцентных измерений приведены на рисунке 3.

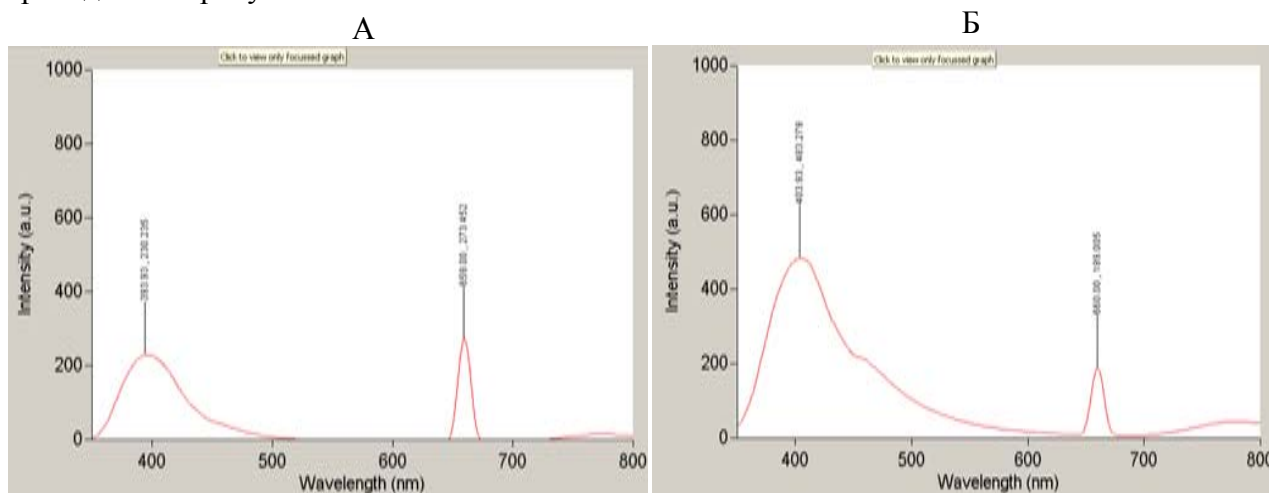


Рисунок 3 – Изменения интенсивности флуоресценции клеток суспензионной культуры петрушки в контроле (А) и после добавления культуральной жидкости грибного фитопатогена *Fusarium culmorum* (Б) при длине волны возбуждения 330 нм

Как видно из приведенных данных, наблюдается существенный прирост интенсивности флуоресценции в области спектра 400–420 нм, при этом положение максимума излучения приходится на длину волны 403 нм не изменяется в присутствии культуральной жидкости.

Спектры регистрировали периодически с интервалом 10 мин для выявления временного хода возрастания концентрации фитоалексинов в клетках при воздействии фитопатогенов. Результаты приведены на рисунке 4.

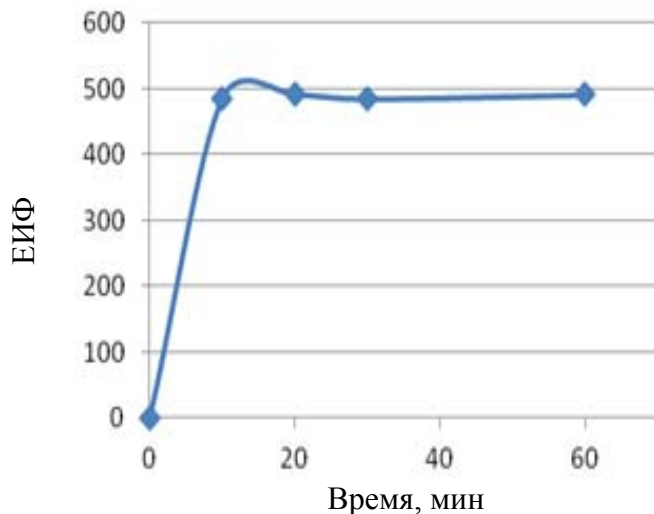


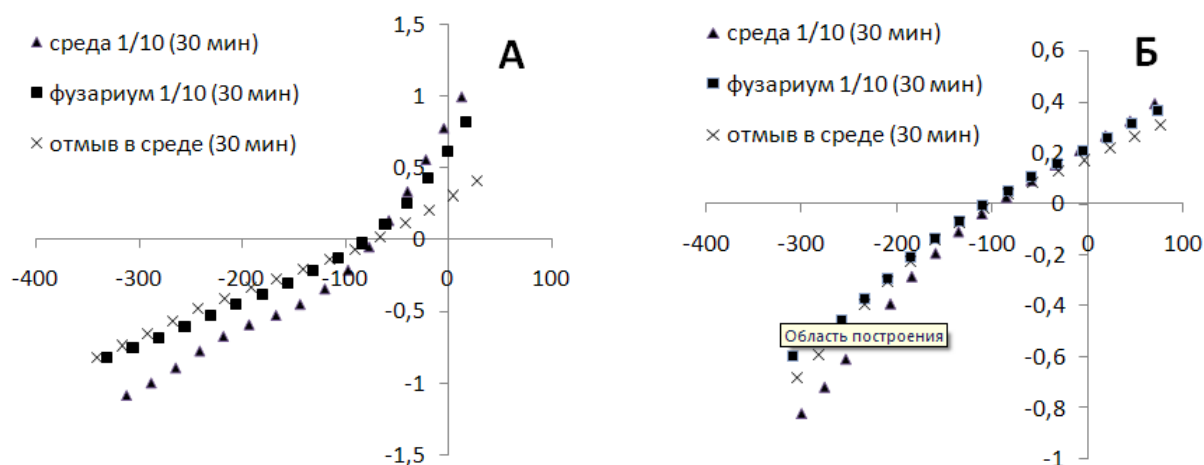
Рисунок 4 – Временной ход изменения максимальной интенсивности флуоресценции (ЕИФ – единицы интенсивности флуоресценции) при добавлении к суспензионной культуре петрушки грибного фитопатогена *Fusarium Culmorum*

Как видно из приведенных данных, возрастание уровня фитоалексинов в клетках суспензионной культуры петрушки происходит быстро, за время не более 10 мин, и в дальнейшем с течением времени до 60 мин практически не меняется.

Далее были проведены эксперименты по выявлению мембранной реакции растительных клеток на культуральную жидкость грибного фитопатогена *Fusarium Culmorum* с использованием модельных клеток *Nitella flexilis*. При замене раствора искусственной прудовой воды на раствор, имитирующий культуральную жидкость гриба, наблюдается небольшая продолжительная деполяризация плазматической мембраны и небольшое снижение сопротивления. По истечению 15 минут происходила стабилизация электрофизиологических параметров плазматической мембраны – стабилизация величины ее сопротивления и разности потенциалов покоя. Далее происходила замена раствора,

имитирующего культуральную жидкость гриба на культуральную жидкость фитопатогена и все наблюдаемые эффекты можно было относить к действию фитопатогена.

Регистрировали вольт-амперные кривые плазматической мембраны для калиевых каналов выходящего и входящего выпрямления; типичные зависимости показаны на рисунке 5.



А – кривые для наружу выпрямляющих калиевых каналов,  
Б – для внутрь выпрямляющих калиевых каналов

Рисунок 5 – Мгновенные вольт-амперные характеристики плазматической мембраны клеток *Nitella flexis* при взаимодействии с грибным фитопатогеном *Fusarium cilmorum*

Из зависимостей, показанных на рисунке 5А, где показаны типичные вольт-амперные кривые для ионных калиевых каналов выходящего выпрямления, видно, что при добавлении культуральной жидкости фитопатогена снижаются входящие и выходящие токи со сдвигом потенциала реверсии в направлении гиперполяризации. При отмыве, то есть при возвращении к раствору, имитирующему состав среды культивирования гриба, наблюдается частичное восстановление первоначальных характеристик плазматической мембраны.

На рисунке 5А показаны типичные вольт-амперные кривые для каналов входящего выпрямления. Здесь также наблюдается снижение входящих и выходящих токов при замене среды культивирования на культуральную жидкость фитопатогена.

Для количественной оценки наблюдаемых сдвигов были измерены входящие и выходящие токи и также значение потенциала реверсии. Измерения проводились на одинаковых расстояниях от потенциала реверсии, минус 200 мВ для тока входящего направления при гиперполяризации клеточной мембраны и +120 мВ – для тока выходящего направления при деполяризации. Измерения проводили по истечении 30 мин от начала действия на клетку культуральной жидкости фитопатогена.

Из приведенных данных видно, что культуральная жидкость гриба достоверно снижает величины как входящего, так и выходящего токов для каналов обоих типов, причем обратимость этих эффектов неполная. Также наблюдается заметное смещение в направлении гиперполяризации величины потенциала реверсии для токов через каналы обоих типов.

Величина мембранного потенциала является результатом электрически параллельного соединения трех компонент, трех механизмов транспорта ионов через клеточную мембрану, обладающих своими электродвижущими силами и электрической проводимостью. Это селективные к калию ионные каналы, неселективные катионные каналы и электрогенная  $H^+$ -АТФ-азная помпа. Очевидно, что общая проводимость мембраны будет определяться наибольшим значением из этих трех, а общая разность потенциалов (потенциал реверсии) будет ближе к электродвижущей силе той компоненты, проводимость которой превалирует над остальными.

Полученные данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что при действии культуральной жидкости гриба происходит приблизительно одинаковое понижение величины входящего и выходящего тока на 36–37%. Для кривых, относящихся к каналам выходящего выпрямления, это видно особенно хорошо. В меньшей степени данный результат характерен для каналов входящего выпрямления. Это говорит о том, что проводимость каналов выходящего выпрямления снижается в большей степени, чем проводимость неселективных каналов.

Таблица 1 – Усредненные значения токов и величины потенциала реверсии, измеренные по вольт-амперной характеристике для наружу- и внутрь-выпрямляющих калиевых каналов

Условия опыта	Измеряемый параметр	Тип каналов	
		Наружу выпрямляющий	Внутри выпрямляющий
Среда	I входящий, $\mu\text{A}$	$-0,99 \pm 0,13^{**}$	$-0,89 \pm 0,12^{**}$
	I выходящий, $\mu\text{A}$	$0,70 \pm 0,13^*$	$0,62 \pm 0,20^*$
	V реверсии, mV	$-69,93 \pm 3,42^*$	$-111,67 \pm 4,44^*$
Фузариум	I входящий, $\mu\text{A}$	$-0,63 \pm 0,05^{**}$	$-0,67 \pm 0,09^{**}$
	I выходящий, $\mu\text{A}$	$0,44 \pm 0,06^*$	$0,49 \pm 0,15^*$
	V реверсии, mV	$-75,53 \pm 2,56^*$	$-115,33 \pm 2,79^*$
Отмыв	I входящий, $\mu\text{A}$	$-0,79 \pm 0,23$	$-0,86 \pm 0,22$
	I выходящий, $\mu\text{A}$	$0,56 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,10$
	V реверсии, mV	$-72,37 \pm 3,87$	$-111,88 \pm 2,05$

Примечания. \* –  $p \geq 0,01$  – достоверность отличия 99% по отношению к контролю (среда); \*\* –  $p \geq 0,05$  – достоверность отличия 95% по отношению к контролю (среда);

Таблица 2 – Относительные изменения входящих и выходящих токов и величин потенциала реверсии при действии культуральной жидкости фитопатогена на растительную клетку

Тип ионных каналов	Входящий ток, $\mu\text{A}$	Выходящий ток, $\mu\text{A}$	Потенциал реверсии, mV
Каналы наружу-направленного выпрямления	0,64	0,63	1,08
Каналы внутрь-направленного выпрямления	0,76	0,78	1,03

Такого рода интерпретация данных возможно исходя из того, что если бы культуральная жидкость фитопатогенного гриба действовала на неселективные каналы, то изменения значений входящих и выходящих токов были бы одинаковыми, чего экспериментальные данные не показывают.

С другой стороны, зарегистрированный гиперполяризационный ответ мембраны на патоген может быть также обусловлен как частичной активацией электрогенной водородной помпы, так и снижением проводимости каналов, шунтирующих её. Таким образом, направление реакции ионной проводимости и потенциала плазматической мембраны на внеклеточные выделения фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum*, по-видимому, указывает на защитную реакцию клетки, а не токсическое действие гриба, поскольку данная реакция препятствует выходу  $\text{K}^+$  из цитоплазмы.

При проведении экспериментов на суспензии клеток петрушки было обнаружено такое же быстрое выделение фитоалексинов, как и изменения мембранного потенциала и проводимости мембраны клеток *Nitella flexilis*. Это дает основание полагать, что выброс фитоалексинов является ответом клетки, по крайней мере коррелятивно связанным с ее мембранной реакцией, так как время ответа приблизительно одинаково – в пределах 10 мин. Учитывая, что скорость реакции плазматической мембраны практически совпадает со

скоростью увеличения концентрации фитоалексинов, можно сделать вывод, что две данные реакции могут быть единым защитным механизмом растительных клеток.

#### Список литературы

1. Booth, C. *Fusarium: Laboratory Guide to the Identification of the Major Species* / C. Booth // Commonwealth Mycological Institute. – 1977. – 66 p.
2. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria / P.R. Davidsson [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2013. – Vol. 4. – P. 264–272.
3. Тарчевский, И.А. Фотосинтез и засуха / И.А. Тарчевский. – Казань: Изд-во Казанского университета, 1964. – с. 198.
4. Boller, T. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors / T. Boller, G. Felix // *Annual review of plant biology.* – 2009. – Vol. 60. – P. 379–406.
5. Юрин, В.М. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток / В.М. Юрин, А.И. Соколик, А.П. Кудряшов. – Минск, 1991. – 271 с.

### FAST RESPONSE OF PLANT CELL ON THE APPLICATION OF EXTRACELLULAR EXCRETIONS OF PLANT PATHOGENIC FUNGI *FUSARIUM CULMORUM*

A.I. Sokolik, V.V.Samohina, V.S. Szarinov, Rafid Mehdy

*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

*e-mail: Sokolik@bsu.by*

Plant pathogenic fungi give rise numerous plant diseases such as root rot and other phytopathological processes, resulting in considerable yield losses. One of the most effective ways to fight pathogens – it's elevated resistance of plants, which involves knowledge all stages of interaction of pathogenic fungi with the plant, and particularly entry. The first plant cell structure, which reply to to extracellular release of the pathogen is the plasma membrane and then turn on the circuit protective reactions, including the allocation of special tread compounds – phytoalexins.

So, the aim of this work was to study plant cell primary reaction to the impact of the Plant pathogenic fungi by recording the response of the cellular plasma membrane and changes in the level fitoaleksins. The cultured parsley cells and single cell of freshwater algae were used as the objects, with the methods of fluorescence spectroscopy and electrophysiological microelectrode techniques.

In the course of the work of the plant cell plasma membrane response on plant pathogenic fungi as well as the increasing of phytoalexins level were demonstrated. It was shown that the nature and direction of membrane ionic permeability changes and the difference in electrical potentials of the plasma membrane in response to the fungi aimed at preventable-release of potassium from the cells, that is, represent the initial part of a defensive reaction. We also show a significant increase in the level of phytoalexins by the action of the cells of the extracellular secretions *Fusarium culmorum*. The both reactions occur quickly, for up to ten minutes from the beginning of exposure of cells to the liquid culture of the fungus.

Thus, based on the temporal proximity to the reaction parameters of the plasma membrane and increase the level of phytoalexins, one can conclude on the relationship of these two protective processes.