

УДК 632.651+632.938+581.2:577.115.3

РАНЕВАЯ РЕПАРАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ (Обзор)

© 2011 г. Н. И. Васюкова, Г. И. Чаленко, Н. Г. Герасимова, О. Л. Озерецковская

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: ozeretskovskaya@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 31.05.2010 г.

Проанализированы сигнальные системы, ответственные за процесс репарации растений и экспрессию защитных эффектов растительных тканей. Особое внимание уделено мобильному системному сигналу процесса репарации – жасмоновой кислоте, биосинтезу жасмонатов и транспорту сигнала в места индуцирования защитных ответов растения. Рассмотрены основные защитные ответы клубней картофеля, индуцированные поранением.

Исследование процессов репарации поранений крайне важно для познания механизмов фитоиммунитета и разработки методов его интенсификации с целью защиты от фитопатогенов и неблагоприятных условий среды. Еще в начале прошлого века [1] было отмечено, что на поверхности поранения клубня кольраби (*Brassica oleracea* L.) образуются некие вещества, стимулирующие процессы заживления. При промывании поверхности среза такие вещества удаляются и процесса заживления не происходит. Впоследствии [2] из пораненных бобов (*Vicia faba* L.) выделили соединение, стимулирующее клеточное деление и образование раневой перидермы, которое было названо травматической кислотой и идентифицировано как 2-Z-додецен-1,2-дикарбоновая кислота. Травматическая кислота была выделена из растительных экстрактов и получила название “раневого гормона”. Ее влияние на метаболизм растений оставалось недостаточно ясным, хотя предполагалось, что травматическая кислота способна изменять уровень фосфорилирования белков, вызывать деление и рост неповрежденных клеток растений, а также вызывать образование каллуса.

Показано, что травматическая кислота взаимодействует с рецепторами плазмалеммы растений и таким образом “включает” соответствующие сигнальные системы. Однако возможно и прямое действие травматической кислоты на протеинкиназы и протеинфосфатазы растительных тканей, что изменяет спектр фосфорилирования белков.

В конце девяностых годов прошлого столетия благодаря достижениям техники биохимического анализа стали появляться работы, позволяющие расшифровать последовательность событий, ответственных за процессы раневой репарации.

Наиболее существенный вклад в понимание процессов раневой репарации был внесен работами американского биохимика К. Райана с сотрудниками, которые показали, что механические поране-

ния листьев томатов и картофеля (*сем. Solanaceae*) системно экспрессировали гены ингибиторов протеиназ (ИП) [3]. Последние хотя и не синтезируются конститутивно, но накапливаются до высокого уровня локально и системно после поранения растительной ткани. С тех пор продуцирование ИП стало использоваться как модельная система в работах по исследованию раневой сигнализации, более того, ИП были признаны ее маркером. ИП функционируют как защитные белки, предохраняющие ткани растений от последствий механических поранений, а также повреждений, вызываемых насекомыми.

Почти все ИП растений представляют собой пептиды или небольшие белки, не содержащие углеводов. Предполагается, что ИП устойчивы к действию протеиназ, хотя имеются и исключения из этого правила. Как правило, рассматриваются три главные функции ИП: запасные белки растений, регуляторы ферментативных процессов, составная часть защитной системы растений.

Механизмы раневой репарации активируются как непосредственно в местах поранения, так и в тканях, удаленных от сайта локального воздействия, в результате чего индуцируются системные защитные ответы растения [4]. В индукции системной защиты участвует мобильный сигнал, передающий информацию о раневом стрессе по всему растению или его органу. В настоящее время установлено, что главными компонентами мобильного сигнала являются 18-аминопептид, названный системин, а также жасмоновая кислота (ЖАК), а возможно и некоторые оксипептиды, возникающие в процессах липоксигеназного окисления.

Системин и ЖАК – основные компоненты сигнала раневой репарации растительных тканей. Системин является единственным пептидом, обладающим в растениях гормоноподобным действием. Этот аминокислотный пептид обнаружен в лаборатории Рай-

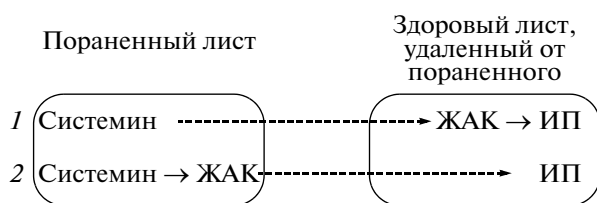


Рис. 1. Две модели (1, 2) взаимодействия системина и ЖАК в процессе индукции системной раневой сигнализации.

ана в 1992 г. как специфический индуктор образования ИП [5, 6].

Системин представляет собой обогащенный пролином полипептид, содержащий 18 аминокислотных остатков, способный индуцировать системную экспрессию ИП [7]. Установлено, что локальное поранение листьев томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill) приводило к образованию системина в результате протеолитического разрушения 200-аминокислотного предшественника – просистемина, который накапливался в паренхимных клетках флоэмы томатов и картофеля (*Solanum tuberosum* L), подтверждая, что паренхима флоэмы включается в системную раневую сигнализацию [4, 8]. Ферменты, с помощью которых происходит протеолитическое разрушение просистемина, пока еще не идентифицированы. Неясно также, как системин выделяется из паренхимы флоэмы для связывания на мембране клетки с рецептором SR160, который представляет собой протеинкиназу, обогащенную остатками лейцина [9].

Предполагается [4], что участие системина в системной сигнализации томатов может осуществляться двумя путями: 1) системин образуется в местах поранения и далее транспортируется в отдаленные листья, где и участвует в активировании биосинтеза октадеканойдов и последующей экспрессии ИП; 2) системин образуется на сайте поранения, где он индуцирует образование ЖАК, которая далее функционирует, как мобильный сигнал для экспрессии ИП (рис. 1). Обе модели предполагают, что для функционирования раневого ЖАК-зависимого сигнального пути требуется участие обоих компонентов раневой сигнализации (системина и ЖАК), распознавание системного сигнала в удаленных тканях растений, а также присутствие ЖАК в местах индуцирования системных защитных ответов.

Пока системин обнаружен только в надземных органах (но не в корнях) томатов и картофеля (сем. Solanaceae) и не обнаруживается у *Arabidopsis thaliana* L. (сем. Brassicaceae), который, очевидно, обладает иными регуляторами сигнального каскада, индуцированного поранением [9, 10].

В результате связывания системина с рецептором на мембране растительной клетки активирует-

ся октадеканойдный путь биосинтеза жасмонатов, которые образуются из α -линоленовой кислоты с помощью ферментов липоксигеназного окисления [11–13]. Линоленовая кислота высвобождается из фосфолипидов мембран [14] при участии фосфолипаз и окисляется 13-липоксигеназой до 13-гидроперокси-октадекатриеновой кислоты. Последняя дегидрирует с помощью алленоксидсинтазы с образованием нестабильного алленоксида с последующей циклизацией до 12-оксофитодиеновой кислоты (ОФДК) [15]. Вышеназванные реакции осуществляются в пластидах, тогда как дальнейшие финальные энзиматические превращения октадеканойдов происходят в пероксисомах, в которые перемещается ОФДК. В пероксисомах ЖАК высвобождается из КоА-эфира с помощью тиоэстеразы [16]. Все гены, кодирующие ферменты, вовлеченные в биосинтез ЖАК, экспрессируются в ответ на поранение. Образование ЖАК способны активировать абсцизовая кислота, этилен, пероксид водорода, УФ, олигогалактоурониды и аминоконъюгаты жирных кислот, в то время как салицилаты и оксид азота подавляют синтез ЖАК [11].

Наряду с ЖАК в тканях растений присутствуют ее производные, которые продуцируются в пероксисомах в процессах метилирования, гликозилирования, гидроксиглирования, сульфоглирования, декарбоксиирования, конъюгации с аминокислотами. Производные ЖАК способны регулировать системные защитные раневые ответы. Помимо ЖАК, роль сигнальной молекулы в ЖАК-зависимом сигнальном пути способен выполнять ЖАК-изолейцин [17]. Другое производное ЖАК – метил-ЖАК участвует в защитных реакциях растений к абиотическим стрессам, а также в индукции устойчивости против фитопатогенов [18]. Метил-ЖАК способен действовать как диффузный межклеточный мессенджер или летучий сигнал для коммуникации между растениями, выполняя роль сигнала тревоги. Однако непосредственные данные о специфической роли метил-ЖАК в системной раневой сигнализации или других межклеточных сигналах пока еще ограничены. Предполагается, что системная экспрессия ИП, индуцированная поранением, медируется скорее сигналом, который транспортируется внутри растений, чем фактором, который диффундирует через атмосферу. Роль такого мобильного сигнала для экспрессии защитных генов при раневой репарации выполняет ЖАК. Установлено, что ЖАК может транспортироваться по флоэме в отдаленные участки растения [4, 19, 20]. Система плазмодесм позволяет ЖАК достигать клетки-мишени, оповещая растение о стрессовой ситуации и включая экспрессию генов ИП (рис. 2).

Существует три линии доказательств того, что ЖАК является необходимым компонентом мобильного системного сигнала раневой репарации.

1. ЖАК или ее производные накапливаются в тканях растения в ответ на поранение, что сопровождается активированием ряда ключевых ферментов биосинтеза ЖАК. Раневой стресс приводит к двухфазному возрастанию содержания ЖАК: быстрое накопление эндогенной ЖАК в течение 30 мин после поранения и ее более медленное накопление через 1 сут после раневого воздействия. “Жасмонатный взрыв” сопровождается активированием активности липоксигеназы, которая, в свою очередь, повышает синтез ЖАК и способствует возникновению второго пика накопления ЖАК [21].

2. Экзогенная ЖАК индуцирует экспрессию тех же защитных генов, что и поранение, в том числе генов ИП [3, 12].

3. При инактивации генов биосинтеза ЖАК подавляется защитная реакция растений на поранение [11].

Большинство генов растений томатов, индуцированных ЖАК или поранением, экспрессируются *COI1*-зависимым способом [11]. При анализе мутанта *coi1* арабидопсиса был идентифицирован ген *COI1* (*coronatine-insensitive1*), который играет роль ключевого компонента ЖАК-сигнального пути. Он кодирует F-box-белок с м.м. 66 кДа, обогащенный участком многократно повторяющихся остатков лейцина [22]. F-box-белок является частью убиквитинлигазного комплекса, участвующего в деградации репрессорных белков – JAZ-белков (*Jasmonate-ZIM* = *JAS-Zink-finger inflorescence meristem*) с помощью убиквитина в 26S-протеосоме в ответ на поранение или обработку растений ЖАК. При поранении в клетках растений индуцируется синтез одного или более биоактивных жасмонатов (особенно существенным, кроме ЖАК, является ЖАК-изолейцин), повышенный уровень которых способствует связыванию JAZ-белков с *COI1*-белком и последующей их деградации, приводя к депрессии защитных генов. Корреляция между экспрессией генов и накоплением жасмонатов в пораненных листьях подтверждает функцию ЖАК как активного системного раневого сигнала, активирующего системные защитные ответы растений [22, 23]. Роль ЖАК как дистанционного раневого сигнала подтверждается также тем фактом, что C^{14} -меченая ЖАК, инъецированная локально, распространяется по флоэме к удаленным листьям в течение нескольких часов и вызывает экспрессию ИП [4]. Пептидный сигнал – системин в тканях томатов усиливает дистанционные защитные ответы с помощью усиления продуцирования ЖАК в тканях растения [8].

Из генетических исследований с томатами [11] были сделаны два важных заключения: 1) жасмонатный путь играет существенную роль в защитных ответах, индуцированных поранением и 2) поранение и системин активируют экспрессию ИП через

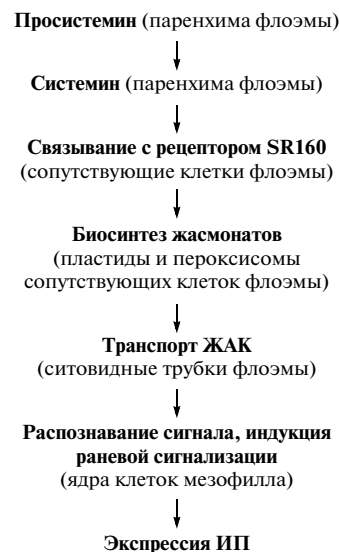


Рис. 2. Индукция раневой сигнализации в листьях томатов.

общий сигнальный путь, который требует наличие ЖАК. В настоящее время установлено, что ЖАК-зависимая сигнализация является частью широкой сети внутрисвязанных путей сигнализации, которые координируют ответ хозяина на различные биотические и абиотические стрессы [24].

Индукцированные защитные ответы растений. События, происходящие в раневой и прираневой зонах растений, имеют целью репрограммирование клеточного генома для реализации защитных эффектов растительной ткани. Представляло интерес проанализировать защитные ответы на примере пораненных клубней картофеля, которые являются классической моделью для исследования процессов раневой репарации.

Естественно предположить, что процессы раневой репарации связаны с энергетическими затратами, которые необходимы для формирования механических барьеров на пути проникающей инфекции, а также многочисленных процессов синтеза защитных соединений.

Определения показали [25], что в клетках прираневой зоны клубней картофеля исчезал крахмал и возрастало содержание моносахаров, которые, по-видимому, и используются в качестве субстрата для реализации энергетических затрат. В тканях механически пораненного клубня значительно возрастало содержание митохондриального белка. Возросшее количество митохондриального белка является системным: даже в нескольких сантиметрах от области поранения его содержание превышало контрольный вариант. Проведенные электронно-микроскопические исследования тканей, находящихся в зоне поранения клубней, показали, что возрастание содержания митохондриального



Рис. 3. Схема терпенового биогенеза в интактных и поврежденных клубнях картофеля. ФСТ – фитостерины, ГА – гликоалкалоиды. Цифры обозначают количество стероидов и ГА (мкг/г сырой ткани).

белка связано с увеличением количества митохондрий.

Вновь образованные митохондрии являются энергетически столь же активными, как и митохондрии неповрежденной ткани. Таким образом, дефицит энергии, возникающей в процессе поранения, удовлетворяется не за счет возрастания степени сопряжения дыхания с фосфорилированием у уже существующих митохондрий, а вследствие увеличения числа митохондрий, являющихся энергетическими центрами клеток.

К числу защитных ответов клубней картофеля на поранение относится образование раневой перидермы, состоящей из многих рядов плотно прилегающих друг к другу клеток, оболочки которых адкрустированы суберином. Прообразом раневой перидермы является естественная перидерма, покрывающая клубень снаружи [26]. В процессе образования перидермы паренхимные клетки клубня картофеля приобретали меристематическую активность. В них закладывалась вторичная меристема или пробковый камбий (феллоген), при делении которого и образуется раневая перидерма.

Образовавшаяся перидерма является не только механическим, но и токсическим барьером, препятствующим проникновению патогенов в ткани клубней. В составе перидермы присутствует высокое содержание токсических соединений – фенолов и стероидных гликоалкалоидов (α -соланин и α -чаконин). В паренхимной ткани интактных клубней картофеля количество фенолов в десятки раз меньше, чем в составе раневой перидермы, тогда как гликоалкалоиды (ГА) в паренхиме отсутствуют. ГА подавляют развитие фузариоза (*Fusarium culmorum* W.G.Sm.) на порядок сильнее, чем самые токсичные фенольные соединения. Весьма существенно также, что и фенолы, и особенно ГА залегают в прираневом слое клубня строго локаль-

но, что еще более увеличивает степень их токсичности для фитопатогенов [27].

Защитными ответами картофеля, возникающими в ответ на поранение, является образование ИП, о чем уже упоминалось выше. ИП выполняют важную роль в инактивировании протеаз фитопатогенов и насекомых, участвуют в защите растений от неблагоприятных факторов среды, а также регулируют ферментативные процессы, протекающие при прорастании клубней. Исследования показали, что ингибиторы сериновых протеиназ выделялись в диффузаты клубней картофеля сразу же после поранения. Через 1 сут активность ИП уменьшалась, а спустя 72 ч исчезала совсем [28].

К числу защитных эффектов процесса раневой репарации клубней картофеля относится модификация стероидного биогенеза в зоне поранения. Известно, что основным патогеном картофеля служит возбудитель фитофтороза оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Оказалось, что *P. infestans* является ауксотрофом в отношении образования стероидного ядра и в силу этого патоген вынужден заимствовать необходимые ему стероиды из тканей своего хозяина – картофеля. В отсутствие стероидов у фитофторы нарушается формирование цитоплазматической мембраны зооспор [29]. Добавление стероидов в культуральную среду для роста фитофторы способствовало половому и бесполому размножению паразита, а также повышало его патогенность. Успешное паразитирование оомицета на картофеле в значительной степени зависит от того, в какой мере патоген способен воспользоваться стероидами своего растения-хозяина. Оказалось, что содержание стероидов в раневой зоне уменьшалось более, чем на треть, причем особенно сильно сократилось количество наиболее благоприятного для размножения и паразитирования фитофторы β -ситостерина, который в па-

ренхимной ткани интактного клубня составляет примерно половину общей фракции стеринов.

В раневой ткани присутствуют предшественники синтеза стеринов: 24-метиллофенол и циклоартенол, что свидетельствует об активно протекающих процессах синтеза стероидного ядра, возможно связанного с образованием стероидных гликоалкалоидов [30]. Дело в том, что начальные этапы биогенеза являются общими как для стеринов, так и стероидных ГА. Возможно, поэтому предположить, что образование этих групп соединений в паренхиме интактной ткани и раневой перидерме являются взаимосвязанными процессами.

Присутствие механического барьера, состоящего из раневой перидермы, и наличие токсических гликоалкалоидов являются серьезным препятствием для раневых патогенов рода *Fusarium*. Наоборот, возбудитель фитофтороза, адаптированный в ходе сопряженной эволюции к картофелю, приобрел способность деградировать такие конститутивные антибиотики, как ГА, разлагая их до уровня агликона — соланидина, существенно менее токсичного, чем соответствующие гликозиды [31]. Поэтому наиболее вероятным препятствием для проникновения фитофторы в клубень картофеля является, с одной стороны, барьер из раневой перидермы, а с другой — недостаток стеринов, необходимых для процесса спороношения фитофторы.

Итогом вышесказанного является рис. 3, на котором сравнивается количество стеринов и ГА (мкг/г сырой ткани) в интактных и поврежденных тканях клубней картофеля.

Интересно отметить, что количественное содержание стеринов и ГА в тканях интактной паренхимы и паренхимы, пораженной совместимой расой фитофторы, практически не различается, хотя является следствием различных причин. Так, в интактной паренхиме ГА не образуются, тогда как в зараженной ткани ГА, если и образуются, то разлагаются оомицетом до менее токсических соединений.

Успешному процессу раневой репарации в клубнях картофеля способствует высокая влажность, температура 18–20°C и свободный доступ кислорода. Такие условия не всегда доступны в поле или условиях хранилища. Именно поэтому особенно существенным является возможность интенсифицировать заживление поврежденных участков картофельной ткани. Ускорить процессы раневой репарации удастся с помощью обработки элиситорами, в качестве которых могут быть использованы хитозан и арахидоновая кислота в соответствующих концентрациях. Эти элиситоры индуцируют не только локальную, но и системную пролонгированную защиту, распространяющуюся по всему растению картофеля [32]. При грамотном использовании элиситоров защищенность расти-

тельных тканей может сохраняться целый год до нового урожая клубней картофеля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haberlandt G.* // Biol. Zentralbl. 1922. В. 42. № 1. S. 145.
2. *English J., Bonner J., Haagen-Smith A.J.* // J. Amer. Chem. Soc. 1939. V. 61. № 12. P. 3434–3436.
3. *Green T.R., Ryan C.A.* // Science. 1972. V. 175. № 4023. P. 776–777.
4. *Schilmiller A.L., Howe G.A.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. № 2. P. 369–377.
5. *Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C.A.* // Science. 1991. V. 199. № 4. P. 995–998.
6. *Farmer E.E., Johnson R.R., Ryan C.A.* // Plant Physiol. 1992. V. 98. № 3. P. 995–1002.
7. *Ryan C.A.* // Plant Mol. Biol. 1992. V. 19. № 1. P. 123–133.
8. *Narvaez-Vasquez J., Ryan C.A.* // Planta. 2004. V. 218. № 3. P. 360–369.
9. *Scheer J.M., Ryan C.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 4. P. 9585–9590.
10. *Ryan C.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1477. № 1. P. 112–121.
11. *Feussner I., Wasternack C.* // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. P. 275–280.
12. *Rozahl S., Feussner I.* // Plant Lipid / Ed. D.J. Murphy. Oxford: Blackwell, 2004. V. 53. P. 329–454.
13. *Wasternack C., Stenzel I., Hause B., Hause G., Kutter C., Maucher H., Neumerkel J., Feussner I., Miersch O.* // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. № 2. P. 297–306.
14. *Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I.* // Plant Cell. 2002. V. 13. № 12. P. 2191–2209.
15. *Гречкин А.Н., Тарчевский И.А.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 1. С. 132–142.
16. *Li C., Schilmiller A.L., Liu G.I., Jayanty S., Sagaman C., Vrebalov J., Glovannoni J.J., Yagi K., Kobayashi Y.* // Plant Cell. 2005. V. 17. № 6. P. 971–986.
17. *Halitschke R., Baldwin I.T.* // J. Plant Growth Regul. 2004. V. 23. № 2. P. 238–245.
18. *Тарчевский И.А.* // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 2. С. 321–331.
19. *Hause B., Stenzel I., Miersch O., Maucher H., Kramell R., Ziegler J.* // Plant J. 2000. V. 24. № 1. P. 113–126.
20. *Li C., Liu G., Xu C., Lee G.I., Bauer P., Ling H.Q., Ganal M.W., Howe G.A.* // Plant Cell. 2003. V. 15. № 10. P. 1646–1661.
21. *Lee G.I., Howe G.A.* // Plant J. 2003. V. 33. № 3. P. 567–576.
22. *Katsir L., Chung H.S., Koo A.J.K., Howe G.A.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2008. V. 11. № 3. P. 428–435.
23. *Chung H.S., Koo A.J.K., Gao X., Jayanty S., Thines B., Jones A.D., Howe G.A.* // Plant Physiol. 2008. V. 146. № 3. P. 952–964.
24. *Lorenzo O., Solano R.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. № 4. P. 532–540.

25. Платонова Т.А., Акеньшина Г.В., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 1. С. 120–123.
26. Озерецковская О.Л., Чаленко Г.И. // Биохимия иммунитета и покоя растений. М.: ВИНТИ, 1969. С. 70–82.
27. Озерецковская О.Л., Давыдова М.А., Васюкова Н.И., Метлицкий Л.В. // Биохимия иммунитета и покоя растений. М.: ВИНТИ, 1969. С. 22–32.
28. Валужева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Ильинская Л.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 5. С. 601–606.
29. Васюкова Н.И., Давыдова М.А., Озерецковская О.Л., Метлицкий Л.В., Сегаль Г.М. // Микология и фитопатология. 1977. Т. 11. № 6. С. 480–487.
30. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. // Успехи современной биологии. 1980. Т. 89. № 1. С. 28–40.
31. Озерецковская О.Л., Давыдова М.А., Васюкова Н.И., Метлицкий Л.В. // Докл. АН СССР. 1971. Т. 196. № 6. С. 1470–1473.
32. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Ревина Т.А., Валужева Т.А. // Докл. РАН. 2008. Т. 423. № 1. С. 129–132.

Wound Repair in Plant Tissues (Review)

N. I. Vasyukova, G. I. Chalenko, N. G. Gerasimova, and O. L. Ozeretskovskaya

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

e-mail: ozeretskovskaya@inbi.ras.ru

Received May 31, 2010

Abstract—Signaling systems responsible for repair processes in plants and manifestation of defensive effects in plant tissues were analyzed. Special attention was given to jasmonic acid, a mobile systemic repair signal, as well as to jasmonate biosynthesis and signal transport to the areas where protective responses of plants are induced. The main defense responses of potato tubers induced by wounding were considered.