

Оригинальная статья / Original article

УДК 581.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-403-412>



## Экзогенный кальций модулирует активность аденилатциклаз растений картофеля при биотическом стрессе

© Н.В. Филинова, Л.А. Ломоватская, А.С. Романенко

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,  
г. Иркутск, Российская Федерация

**Резюме:** Целью данного исследования являлось изучение влияния различных концентраций ионов кальция на активность трансмембранной (тМАЦ) и растворимой форм аденилатциклаз (рАЦ) из клеток корней и стеблей растений двух сортов картофеля, контрастных по устойчивости к возбудителю кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) на фоне воздействия его экзополисахаридов. Результаты экспериментов показали, что реакция тМАЦ из корней и стеблей на экзогенный  $Ca^{2+}$  оказалась почти противоположной у растений обоих сортов. В клетках корня растений устойчивого сорта 1 и 10 мМ  $Ca^{2+}$  весьма интенсивно активировал тМАЦ. В то же время в стебле средние концентрации  $Ca^{2+}$  ингибировали активность тМАЦ, а самые высокие – 1 и 10 мМ, на нее не влияли. Напротив, активность тМАЦ из клеток корня растений восприимчивого сорта незначительно активировалась повышенными концентрациями  $Ca^{2+}$ , но в стеблях все концентрации  $Ca^{2+}$ , начиная с 1 мкМ, существенно повышали активность тМАЦ. Таким образом, неодинаковая реакция аденилатциклаз растений картофеля обоих сортов на различные концентрации экзогенного кальция свидетельствует, скорее всего, о наличии нескольких изоформ этого фермента, отличающихся по чувствительности к ионам кальция. При этом, возможно, растения обоих сортов также отличаются по спектру таких изоформ. Исходя из того, что под воздействием экзополисахаридов Cms чувствительность к ионам кальция обеих форм аденилатциклаз существенно менялась в клетках растений обоих сортов, можно предположить, что эта особенность является одним из механизмов различной устойчивости растений данных сортов к патогену.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*, кальций, трансмембранная и растворимая аденилатциклазы растений, биотический стресс

**Благодарности:** Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» и с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках Проекта научно-исследовательских работ, № государственной регистрации 121031300011-7.

**Для цитирования:** Филинова Н.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С. Экзогенный кальций модулирует активность аденилатциклаз растений картофеля при биотическом стрессе. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 403–412. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-403-412>

## Exogenous calcium modulates the activity of adenylate cyclases in potato plants under biotic stress

Nadegda V. Filinova, Lidiya A. Lomovatskaya, Anatoliy S. Romanenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,  
Irkutsk, Russian Federation

**Abstract:** This article aims to study the influence of different concentrations of calcium ions on the activity of transmembrane (tmAC) and soluble forms of adenylate cyclase (sAC) in the cells of roots and stems of the plants of two types of potatoes. It compares and contrasts their stability to the agent of the annular rot *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* (Cms) when exposed to its exopolysaccharides. The experimental results have shown that the reaction of tmAC from the roots and stems to exogenous  $Ca^{2+}$  was almost oppo-

site in the plants of both types. In the root cells of the plants of the resistant types, 1 and 10 mM of  $Ca^{2+}$  have activated tmAC in a very intensive way. In the stem, the average concentrations of  $Ca^{2+}$  inhibited the tmAC activity, while the highest, 1 and 10 mM, did not affect it. The activity of tmAC taken from the root cells of the receptive type of plants was not activated significantly by the increased concentrations of  $Ca^{2+}$ , whereas, in the stems, all the concentrations of  $Ca^{2+}$ , tmAC activity increased substantially starting with 1  $\mu$ M. Thus, the unequal reaction of adenylate cyclases of the potato plants of both types to different concentrations of exogenous calcium, testifies, most likely, the presence of several isoform of this ferment that differ in the sensitivity to calcium ions. At the same time, it is possible that the plants of both types may also differ in the spectrum of such isoforms. Since the influence of Cms exopolysaccharides significantly changes the sensitivity to the calcium ions of both forms of adenylate cyclases in the cells of plants of both types, it can be assumed that this feature is one of the mechanisms of these plants' resistance to the pathogen.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, calcium, transmembrane and soluble plant adenylate cyclases, biotic stress

**Acknowledgments:** The work was carried out using the equipment of the Center for Collective Use "Bioanalytica" and the collections of the Center for Collective Use "Bioresource Center" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk).

**Funding:** The study was conducted as part of the Research Project (Federal registration number 121031300011-7).

**For citation:** Filinova NV, Lomovatskaya LA, Romanenko AS. Exogenous calcium modulates the activity of adenylate cyclases in potato plants under biotic stress. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):403–412. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-403-412>

## ВВЕДЕНИЕ

Аденилатциклазная сигнальная система растений включает несколько ключевых компонентов: аденилатциклазы (АЦ), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и цАМФ, синтезируемый АЦ, – специфичные фосфодиэстеразы, переводящие его в неактивную нециклическую форму. Кроме того, имеются протеинкиназы и другие специфические белки, активируемые цАМФ. Как и во всех живых системах, цАМФ в растениях выполняет роль вторичного посредника, участвующего в каскадной передаче сигналов в геноме содержащие органеллы клетки. Эта сигнальная система в числе других регулирует метаболизм растений как в нормальных, так и в стрессовых условиях [1].

В последние годы появились работы, посвященные исследованию структуры растительных АЦ, где показано, что данный фермент представляет собой отдельный домен, входящий в состав мультифункциональных комплексов. Так, АЦ была обнаружена в составе R-белка ADB66335.1 из *Populus trichocarpa* [2],  $K^+$ -зависимой пермеазы 7 (AtKUP7) [3], а также в эндоцитозных пузырьках в составе клатринового белкового комплекса. Полагают, что цАМФ в данном случае необходим в интернализации патогенных эффекторов в эндоплазматическую сеть и вакуоль растительных клеток [4]. Кроме того, в печеночнике (*Marchantia polymorpha*) АЦ (MrCAPE) объединена в один мультидоменный комплекс с фосфодиэстеразой [5].

Несмотря на интенсификацию исследований АЦ растений, механизмы их внутриклеточной регуляции остаются во многом неясными. В то же время известно, что активность большинства

изоформ трансмембранной аденилатциклазы животных регулируется кальцием при участии кальмодулина или кальцийнейрина [6].

У растений роль кальция в качестве вторичного посредника исследована довольно подробно [7–9]. Передача сигналов с участием кальция происходит благодаря его способности дифференцированно взаимодействовать с клеточными белками, включая ферменты, являющимися ключевыми звеньями в сигнальных системах растений [7]. Кроме того, у растений выявлены неселективные цАМФ-зависимые кальциевые каналы, активность которых возрастает при биотических стрессах. Таким образом, активация АЦ растений влечет за собой открытие таких ионных каналов [10]. В этом случае возникает вопрос, может ли кальций также участвовать в регуляции активности АЦ растений. Поэтому целью данного исследования являлось изучение влияния различных концентраций ионов кальция на активность трансмембранной (tmAC) и растворимой форм аденилатциклаз (pAC) из клеток корней и стеблей растений двух сортов картофеля, контрастных по устойчивости к *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) на фоне воздействия экзополисахаридов (ЭПС) Cms.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.): сорт Луговской – резистентный, сорт Лукьяновский – восприимчивый к возбудителю кольцевой гнили (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* – Cms), *in vitro* культивировали в течение 7 дней на твердой питательной среде Мурасиге – Скуга (Sigma, США) с добавлением 20 г/л сахарозы и 5 г/л агар-агара до образования первичных кор-

ней, затем переносили на жидкую среду и дополнительно культивировали 3–4 недели. *Cms* (вирулентный, мукоидный штамм 5369) выращивали на жидкой среде, содержащей дрожжевой экстракт (10 г/л), глюкозу (15 г/л), pH = 7,0, в течение трех дней. Эндоплазматическую сеть (ЭПС) выделяли из культурального фильтрата и очищали методом колоночной ионообменной хроматографии [11].

Экзополисахариды *Cms* в конечной концентрации 0,1% добавляли к жидкой среде роста растений и выдерживали в течение 1 мин. Растения фиксировали в жидком азоте, затем корень отделяли от стебля. Каждую часть отдельно растирали в 50 мМ Трис-НСI буфере (pH = 7,2) (Sigma, США), приготовленном на деионизованной воде с добавлением 1 мМ дитиотреитола (Sigma, США), ингибитора цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы – 0,1 мМ теофиллина (KRKA, Словения), ингибиторов протеаз – 50 мкг/мл фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ), 50 мкг/мл гидроксимеркурийбензоата (ГМБ), 1 мкг/мл лейпептина (Sigma, США). Гомогенат фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали на центрифуге Allegra 64R при 16000 g (Beckman Coulter, США). Далее проводили дифференциальное центрифугирование на ультрацентрифуге Sorvall Discovery 90SE при 105000 g (США) в течение 3 ч. В результате получали две фракции – мембранную и растворимую, в мембранной фракции определяли тМАЦ, в растворимой – рАЦ. Определение активности ферментов начинали с внесения 500 мкл растительной пробы к 0,5 мМ АТФ (Sigma, США), MgSO<sub>4</sub> (0,5 мМ) и MnCl<sub>2</sub> (3 мМ) служили кофакторами для тМАЦ и рАЦ соответственно. Кальций добавляли в виде CaCl<sub>2</sub> (Реахим, Россия) в следующих конечных концентрациях: 500 нМ, 1 мкМ, 500 мкМ, 1 мМ и 10 мМ. Реакцию проводили при 27 °С в течение 30 мин и останавливали кипячением на водяной бане. Об активности аденилатциклаз судили по концентрации цАМФ, которую определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA), модифицированного нами путем применения первичных поликлональных кроличьих антител против цАМФ (Antibodies-online.com, Германия) и вторичных козьих антител, меченных пероксидазой (Antibodies-online.com, Германия) [12]. Активность фермента рассчитывали на мг белка в мин.

Активность тМАЦ и рАЦ (нмоль/мг белка) в органах растений картофеля *in vitro* под воздействием ЭПС *Cms*

Activity of tmAC and sAC (nmol/mg of protein) in potato plant organs *in vitro* under the influence of *Cms* exopolysaccharides

Часть растения	Сорт картофеля							
	Луговской				Лукьяновский			
	тМАЦ		рАЦ		тМАЦ		рАЦ	
	-ЭПС	+ЭПС	-ЭПС	+ЭПС	-ЭПС	+ЭПС	-ЭПС	+ЭПС
Корни	0,31±0,02	12,2±0,64	0,52±0,02	0,55±0,03	2,4±0,02	1,3±0,12	0,72±0,04	0,08±0,01
Стебли	1,29±0,07	29,7±1,13	0,13±0,01	2,2±0,11	0,23±0,03	0,034±0,002	1,06±0,06	0,2±0,13

Белок в пробе определяли методом Бредфорда. Контролем служили образцы без добавления кальция (вариант «0»).

Эксперименты проводили в 2-кратной биологической повторности, определение уровня цАМФ – в 4-кратной аналитической повторности. Результаты обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На графиках данные представлены в процентах к контролю со стандартной ошибкой. Значимость различий средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

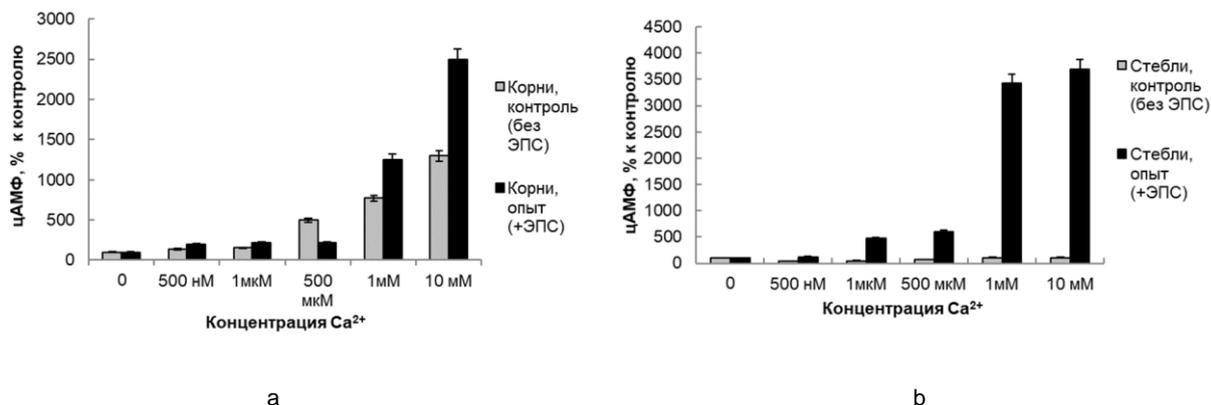
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования показали, что исходная активность тМАЦ и рАЦ весьма существенно менялась под воздействием ЭПС *Cms* и различалась в клетках растений обоих сортов (таблица).

При добавлении ионов кальция к выделенному ферменту в корнях активность тМАЦ возрастала как в варианте без ЭПС, так и на их фоне у растений картофеля сорта Луговской, резистентного к *Cms* (рис. 1, а). При этом в варианте с ЭПС активирующий эффект Ca<sup>2+</sup> повышался в диапазоне 1–10 мМ. В то же время в клетках стеблей тех же растений в варианте без ЭПС активность тМАЦ не изменялась в присутствии всех концентраций ионов кальция, но после добавления ЭПС значительно возрастала, особенно при миллимолярных концентрациях этих ионов (рис. 1, б).

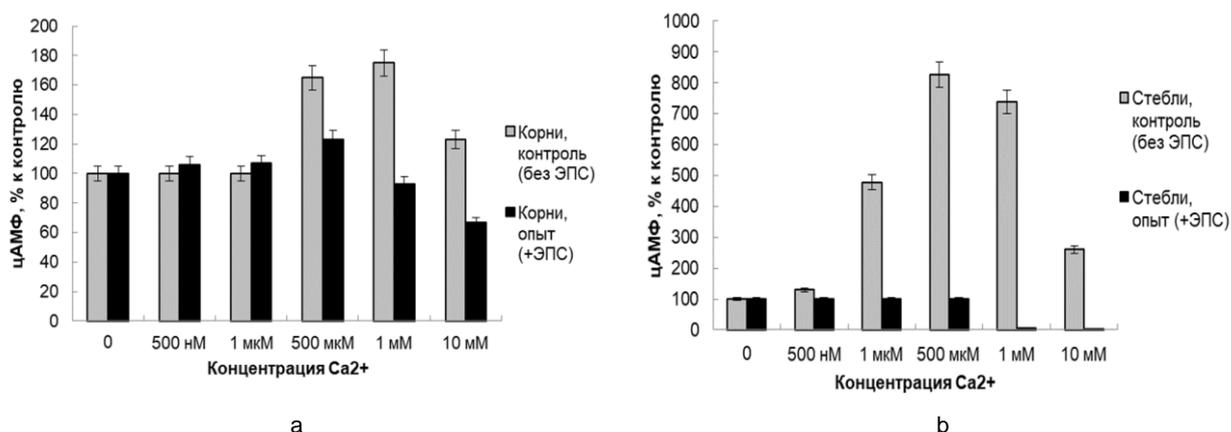
В корнях растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский в варианте без ЭПС низкие концентрации кальция не оказывали влияния на активность тМАЦ, а 500 мкМ и 1 мМ Ca<sup>2+</sup> увеличивали активность фермента в среднем на 70%, тогда как после добавления ЭПС самая высокая концентрация, 10 мМ ионов кальция, напротив, ингибировала его активность на 30% (рис. 2, а).

В стеблях тех же растений в варианте без ЭПС активность тМАЦ существенно стимулировали как низкие, так и повышенные концентрации ионов кальция: 1 мкМ, 500 мкМ и 1 мМ. В то же время после инкубации с ЭПС ее активность почти полностью подавлялась при более высоких концентрациях этого иона – 1 и 10 мМ (рис. 2, б).



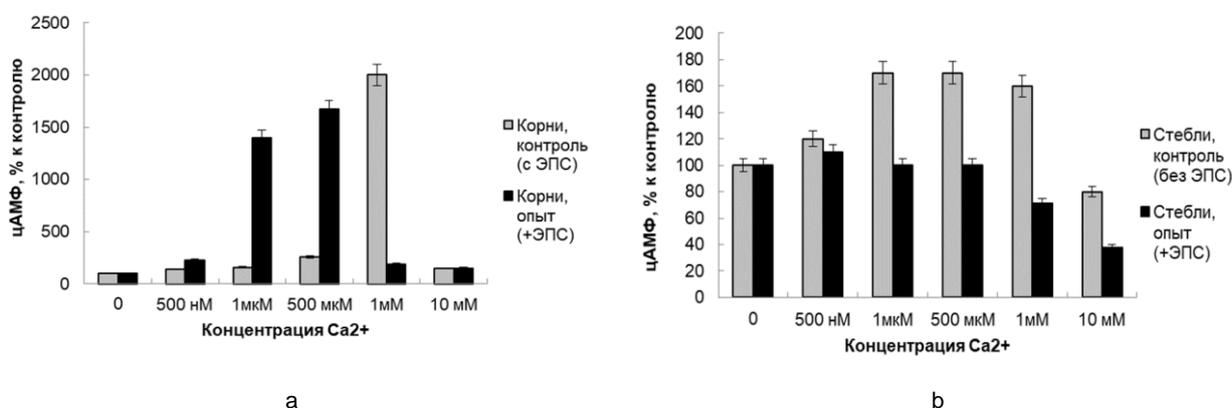
**Рис. 1.** Изменение активности тмАЦ из клеток растений картофеля устойчивого сорта Луговской под влиянием различных концентраций ионов Ca<sup>2+</sup>: а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при P ≤ 0,01

**Fig. 1.** Changes in the activity of tmAC from potato plant cells of the resistant cultivar Lugovskoy under the influence of different concentrations of Ca<sup>2+</sup> ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at P ≤ 0.01



**Рис. 2.** Изменение активности тмАЦ из клеток растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский под влиянием различных концентраций ионов Ca<sup>2+</sup>: а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при P ≤ 0.01

**Fig. 2.** Changes in the activity of tmAC from potato plant cells of the susceptible cultivar Lukyanovskii under the influence of different concentrations of Ca<sup>2+</sup> ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at P ≤ 0.01



**Рис. 3.** Изменение активности рАЦ из клеток растений картофеля устойчивого сорта Луговской под влиянием различных концентраций ионов Ca<sup>2+</sup>: а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при P ≤ 0.05

**Fig. 3.** Changes in the activity of sAC from potato plant cells of the resistant cultivar Lugovskoy under the influence of different concentrations of Ca<sup>2+</sup> ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at P ≤ 0.05

У растворимой формы АЦ была выявлена иная чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$ . В корнях растений устойчивого сорта в контроле (без ЭПС) наибольший активирующий эффект на рАЦ оказывал только 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , тогда как после воздействия ЭПС существенная стимуляция рАЦ наблюдалась при более низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  – 10 и 500 мкМ (рис. 3, а). На рАЦ из стеблей тех же растений почти все концентрации ионов кальция (без воздействия ЭПС) оказывали небольшой стимулирующий эффект, за исключением 10 мМ, когда активность рАЦ ингибировалась. В присутствии ЭПС активность этого фермента оставалась на уровне контроля, за исключением 1 и 10 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , проявивших ингибирующий эффект (рис. 3, б).

В корнях растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский как в контроле, так и после воздействия ЭПС низкие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (500 нМ и 1 мкМ) не оказывали существенного воздействия на эту форму фермента (рис. 4, а), тогда как 500 мкМ, 1 мМ и 10 мМ катиона в присутствии ЭПС ингибировали ее активность. Напротив, в стеблях тех же растений в контроле наблюдалась весьма значительная активация рАЦ концентрациями кальция 500 мкМ и 1 мМ при явном подавлении ее активности при 10 мМ. В присутствии ЭПС максимальная активность рАЦ была зафиксирована при концентрации 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 4, б).

Согласно литературным данным, у животных аденилатциклазная и кальциевая сигнальные системы функционируют в тесном взаимодействии [6]. У млекопитающих активность девяти изоформ тМАЦ может модулироваться ионами кальция, причем отдельные изоформы могут как активироваться, так и ингибироваться ими, а некоторые не чувствительны к  $\text{Ca}^{2+}$  [13, 6]. Одной из функций цАМФ, синтезируемого тМАЦ, является активация нуклеотид-зависимых кальциевых каналов в мембранах органелл клеток животных [13], что поддерживает необходимый ор-

ганоспецифический уровень вторичных мессенджеров, от которых в значительной степени зависит дистанционная внутри- и межклеточная передача сигналов.

У растений в состоянии покоя в цитоплазме концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  составляет 100–200 нМ, что на 3–4 порядка ниже, чем во внутриклеточных компартментах: в митохондриях и ЭПР – около 1 мМ, в клеточной стенке и вакуоли – 1–10 мМ [14].

Результаты экспериментов показали, что реакция тМАЦ из корней и стеблей на экзогенный  $\text{Ca}^{2+}$  оказалась почти противоположной у растений обоих сортов. В клетках корня растений устойчивого сорта 1 и 10 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  интенсивно активировал тМАЦ. В то же время в стебле средние концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ингибировали активность тМАЦ, а самые высокие – 1 и 10 мМ, на нее не влияли. Напротив, активность тМАЦ из клеток корня растений восприимчивого сорта незначительно активировалась повышенными концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$ , но в стеблях все концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , начиная с 1 мкМ, существенно повышали активность тМАЦ. Различия чувствительности изоформ тМАЦ к кальцию отмечены также у животных: тМАЦ1, тМАЦ3 тМАЦ8 активируются высокими концентрациями кальция, тогда как тМАЦ5 и тМАЦ6 ингибируются его физиологическими концентрациями.

Однако, судя по нашим данным, чувствительность тМАЦ из клеток различных органов растений имеет, скорее всего, сортовые особенности. Такое наблюдение еще раз подтверждает предположение о наличии других изоформ тМАЦ у растений картофеля этого сорта. Феномен различных изоформ ферментов у сортов растений картофеля, различающихся по устойчивости к возбудителю кольцевой гнили, известен: показано, что спектр изоформ пероксидазы различается у растений тех же самых сортов картофеля, и это во многом определяет устойчивость сорта картофеля к *Cms* [16].

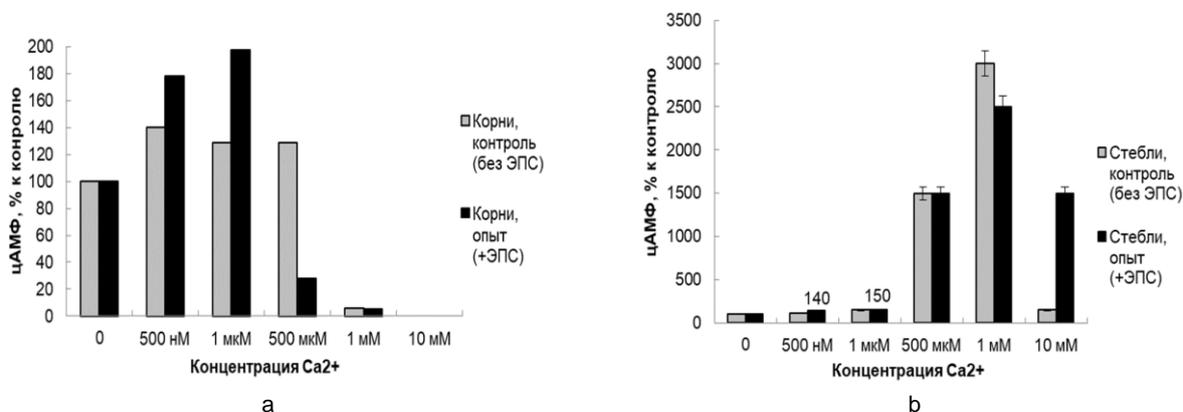


Рис. 4. Изменение активности рАЦ из клеток растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский под влиянием различных концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$ : а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при  $P \leq 0.01$

Fig. 4. Changes in the activity of sAC from potato plant cells of the susceptible cultivar Lukyanovskii under the influence of different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at  $P \leq 0.01$

Известно, что рАЦ из клеток животных также чувствительна к ионам кальция, которые повышают сродство фермента к субстрату [17]. Особенностью данной формы фермента и у животных, и у растений является его локализация во внутриклеточных компартментах, где ионы кальция содержатся в более высокой концентрации, чем в цитоплазме. У растений эта форма фермента была найдена в строме и межмембранном пространстве изолированных хлоропластов табака [18, 19], в клетках корней люцерны [20] и в пыльце *Agapanthus umbellatus* [21].

В наших экспериментах чувствительность рАЦ существенно отличалась как в клетках различных частей растений, так и у растений разных сортов. У растений устойчивого сорта только 1 мМ  $Ca^{2+}$  весьма сильно активировал рАЦ в клетках корня, тогда как в стебле все концентрации, за исключением 10 мМ, незначительно активировали ее активность. В то же время у восприимчивого сорта в корнях рАЦ ингибировалась при повышенных концентрациях  $Ca^{2+}$ , но под влиянием тех же концентраций весьма сильно возрастала в клетках стебля.

Известно, что воздействие биотических стрессоров вызывает у растений резкое и кратковременное повышение уровня цАМФ, которое приводит, в том числе, к активации нуклеотид-зависимых кальциевых ионных каналов [22, 23].

Ранее нами был выполнен цикл работ по влиянию ЭПС *Cms* на уровень цАМФ и активность тМАЦ и рАЦ в клетках растений картофеля *in vitro*, где по этим показателям были выявлены сортовые особенности. Было показано, что при добавлении ЭПС *Cms* к среде роста наблюдалась активация тМАЦ и рАЦ в клетках корня и стеблей растений *in vitro* резистентного сорта картофеля уже через 1 мин воздействия, тогда как в тех же органах растений восприимчивого сорта наблюдалось существенное ингибирование активности АЦ, а незначительная активация появлялась только спустя 15 мин после воздействия [24]. В этих же условиях были исследованы кинетические параметры тМАЦ и рАЦ из клеток корня. Показано, что ЭПС прямо или косвенно оказывали влияние на кинетические параметры этих форм фермента [25]. Активация тМАЦ фторидом натрия, ингибиторный анализ [25], а также результаты выявления рецепторов к *Cms* на плазмалемме клеток тех же сортов картофеля позволили сделать вывод о том, что ЭПС *Cms* выступают в качестве лигандов и оказывают воздействие на тМАЦ через сигнальный каскад, включающий рецептор – G-белок – тМАЦ. Участие рецепторов, связанных с G-елками и тАЦ было показано нами ранее [25], хотя пока трудно более предметно обсуждать, какого типа G-белки присутствуют в клетках картофеля. Ранее в плазмалемме клеток растений восприимчивого сорта картофеля были

выявлены рецепторы, обладающие повышенным сродством к ЭПС *Cms* [26], тогда как в клетках растений устойчивого сорта аффинность к ЭПС отсутствовала. Поскольку ЭПС *Cms* гетерогенны по составу, то предполагалось, что они могут выступать в качестве элиситоров для растений устойчивого сорта картофеля или супрессоров для растений восприимчивого сорта. Авторами работы [27] у *Arabidopsis thaliana* был обнаружен белок, имеющий в своем составе нуклеотид-связывающий сайт с лейциновым повтором (NBS-LRR), который обладает аденилатциклазной активностью. Транскрипция его гена выявлялась при инфицировании растений биотрофными грибами и бактериями, но не менялась под воздействием некротрофного гриба. Было высказано предположение, что мультибелковые комплексы с АЦ в качестве одного из доменов вовлечены в реализацию устойчивости к болезням: связываясь со специфическими вирулентными белковыми факторами, они активируются, в результате чего локально возрастает уровень цАМФ, запускающий дальнейший сигнальный каскад [27].

Несмотря на то что с ЭПС *Cms* контактировали только корни, изменение активности тМАЦ и рАЦ наблюдалось и в стеблях. На основании этого был сделан вывод о том, что в растениях индуцировалась системная реакция аденилатциклазной сигнальной системы [25]. Известно, что под воздействием стрессоров на плазмалемме клеток растений может возникать электрохимический потенциал, системно распространяющийся по всему стеблю [28], а активность тМАЦ может меняться под его воздействием [29]. Модуляция активности тМАЦ приводит к локальному изменению концентрации цАМФ, что способствует активации нуклеотид-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов [22], кратковременно повышая концентрацию ионов кальция в районе плазмалеммы за счет их выхода из свободного пространства клеточной стенки. Можно предположить, что такие изменения уровня цАМФ индивидуальны в клетках растений разных сортов картофеля, поскольку, как обсуждалось выше, связаны с лиганд-рецепторными взаимодействиями. В свою очередь изменение уровня ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле, возможно, оказывает дополнительный супрессирующий эффект на активность тМАЦ в клетках растений восприимчивого сорта, как было показано в данной работе.

Активность рАЦ может модулироваться только под воздействием меняющихся окружающих условий, например, изменения концентрации ионов кальция в цитоплазме или оргanelлах. Поскольку эта форма фермента локализована в основном во внутриклеточных оргanelлах (ядро, хлоропласты, вакуоли), где подерживается, как правило, более высокая концентрация ионов кальция [30], снижение его

концентрации в данных компартментах при стрессе, вероятно, может оказывать модулирующий эффект на активность рАЦ.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, неодинаковая реакция аденилатциклаз растений картофеля обоих сортов на различные концентрации экзогенного кальция свидетельствует, скорее всего, о наличии нескольких изоформ этого фермента, отличаю-

щихся по чувствительности к ионам кальция. При этом возможно, что растения обоих сортов также отличаются по спектру таких изоформ. Исходя из того, что под воздействием ЭПС *Cms* чувствительность к ионам кальция обеих форм аденилатциклаз существенно менялась в клетках растений обоих сортов, можно предположить, что эта особенность является одним из механизмов различной устойчивости растений данных сортов к *Cms*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gehring C., Turek I. Cyclic nucleotide monophosphates and their cyclases in plant signaling // *Frontiers Plant Science*. 2017. Vol. 8. Article 1704. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01704>
2. Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer // *Journal of Molecular Biology*. 2004. Vol. 343. Issue 1. P.1–28. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.023>
3. Al-Younis I., Wong A., Gehring C. The *Arabidopsis thaliana* K<sup>+</sup>-uptake permease 7 (AtKUP7) contains afunctional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre // *FEBS Letters*. 2015. Vol. 589. Issue 21, part B. P. 3848–3852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.038>
4. Chatukuta P., Dikobe T.B., Kawadza D.T., Sehlabane K.S., Takundwa M.M., Wong A., et al. An *Arabidopsis clathrin* assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylate cyclase // *Biomolecules*. 2018. Vol. 8. Issue 2. P. 15. <https://doi.org/10.3390/biom8020015>
5. Kasahara M., Suetsugu N., Urano Y., Yamamoto C., Ohmori M., Takada Y., et al. An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. Article no. 39232. <https://doi.org/10.1038/srep39232>
6. Halls M.L., Cooper D.M.F. Regulation by Ca<sup>2+</sup>-signaling pathways of adenylyl cyclases // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011. Vol. 3. Issue 1. Article no. a004143. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004143>
7. Johnson J.M., Reichelt M., Vadassery J., Gershenzon J., Oelmüller R. An Arabidopsis mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress // *BMC Plant Biology*. 2014. Vol. 14. Issue 1. Article no. 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-162>
8. Hepler P.K. Calcium: a central regulator of plant growth and development // *The Plant Cell*. 2005. Vol. 17. Issue 8. P. 2142–2155. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508>
9. Ma S.Y., Zhao M. Calcium regulation of Arabidopsis salt resistance // *Acta Agronomica Sinica*. 2006. Vol. 32. Issue 11. P. 1706–1711.
10. Moeder W., Urquhart W., Ung H., Yoshioka K. The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity // *Molecular Plant*. 2011. Vol. 4. Issue 3. P. 442–452. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp018>
11. Strobel G.A. Purification and properties of a phytotoxic polysaccharide produced by *Corynebacterium sepedonicum* // *Plant Physiology*. 1967. Vol. 42. Issue 10. P. 1433–1441. <https://doi.org/10.1104/pp.42.10.1433>
12. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method // *Plant Cell Reports*. 2011. Vol. 30. Issue 1. P. 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>
13. Medvedev S.S. Calcium signaling system in plants // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005. Vol. 52. Issue 2. P. 249–270. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0038-1>
14. Willoughby D., Cooper D.M.F. Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains // *Physiological Reviews*. 2007. Vol. 87. Issue 3. P. 965–1010. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2006>
15. Швартау В.В., Вирыч П.А., Маковейчук Т.И., Артеменко А.Ю. Кальций в растительных клетках // *Вестник Днепропетровского университета. Серия: Биология. Экология*. 2014. Т. 22. N 1. С. 19–32. <https://doi.org/10.15421/011403>
16. Graskova I.A., Borovskii G.B., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. Peroxidase as a component of the signaling pathway in potato cells during ring rot infection // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004. Vol. 51. Issue 5. P. 621–626. <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000040747.61131.a9>
17. Tanzarella P., Ferretta A., Barile S.N., Ancona M., de Rasmio D., Signorile A., et al. Increased levels of cAMP by the calcium-dependent activation of soluble adenylyl cyclase in *parkin*-mutant fibroblasts // *Cells*. 2019. Vol. 8. Issue 3. P. 250. <https://doi.org/10.3390/cells8030250>
18. Witters E., Quanten L., Bloemen J., Valcke R., van Onckelen H. Product identification and adenylyl cyclase activity in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004. Vol. 18. Issue 4. P. 499–504. <https://doi.org/10.1002/rcm.1365>
19. Witters E., Valcke R., van Onckelen H. Cytoenzymological analysis of adenylyl cyclase activity and 3':5'-cAMP immunolocalization in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* // *New Phytologist*. 2005. Vol. 168. Is-

sue 1. P. 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01476.x>

20. Carricarte V.C., Bianchin G.M., Muschietti J.P., Téllez-Iñón M.T., Peticari A., Torres N., et al. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*) // *The Biochemical Journal*. 1988. Vol. 249. Issue 3. P. 807–811. <https://doi.org/10.1042/bj2490807>

21. Moutinho A., Hussey P.J., Trevawas A.J., Malho R. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001. Vol. 98. Issue 18. P. 10481–1048. <https://doi.org/10.1073/pnas.171104598>

22. Ma W., Berkowitz G.A. Ca<sup>2+</sup> conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades // *New Phytologist*. 2011. Vol. 190. Issue 3. P. 566–572. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03577.x>

23. Duszyn M., Świeżawska B., Szmidt-Jaworska A., Jaworski K. Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling—Current knowledge and perspectives // *Journal of Plant Physiology*. 2019. Vol. 241. Article no. 153035. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153035>

24. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Криволапова Н.В., Копытчук В.Н., Саляев П.К. Системная активация аденилатциклазы, локализованной в плазмалемме клеток картофеля при бактериальном патогенезе // *Доклады Академии наук*. 2007. Т. 413. N 3. С. 420–423.

25. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Филино-

ва Н.В. Аденилатциклазы растений: влияние биотического стрессора на кинетические параметры трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклазы // *Биологические мембраны*. 2014. Т. 31. N 2. С. 129–136. <https://doi.org/10.7868/S0233475514010071>

26. Romanenko A.S., Lomovatskaya L.A., Shafikova T.N., Borovskii G.B., Krivolapova N.V. Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides // *Journal of Phytopathology*. 2003. Vol. 151. Issue 1. P 1–6. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0434.2003.00667.x>

27. Bianchet C., Wong A., Quaglia M., Alqurashi M., Gehring C., Ntoukakis V., et al. An *Arabidopsis thaliana* leucine-rich repeat protein harbors an adenylyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens // *Journal of Plant Physiology*. 2019. Vol. 232. P. 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.025>

28. Пятыхин С.С., Воденев В.А., Опритов В.А. Деполяризация плазматической мембраны как универсальная первичная биоэлектрическая реакция растительных клеток на действия различных // *Успехи современной биологии*. 2006. Т. 126. N 5. С. 492–502.

29. Cooper D.M.F., Shell M.J., Thorn P., Irvine R.F. Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. Issue 42. P. 27703–27707. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27703>

30. Pittman J.K. Vacuolar Ca<sup>2+</sup> uptake // *Cell Calcium*. 2011. Vol. 50. Issue 2. P. 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.004>

## REFERENCES

1. Gehring C, Turek I. Cyclic nucleotide monophosphates and their cyclases in plant signaling. *Frontiers Plant Science*. 2011;8. Article 1704. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01704>

2. Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology*. 2004;343(1):1–28. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.023>

3. Al-Younis I, Wong A, Gehring C. The *Arabidopsis thaliana* K<sup>+</sup>-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylyl cyclase catalytic centre. *FEBS Letters*. 2015;589(21B):3848–3852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.038>

4. Chatukuta P, Dikobe TB, Kawadza DT, Sehlabane KS, Takundwa MM, Wong A, et al. An *Arabidopsis clathrin* assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylyl cyclase. *Biomolecules*. 2018;8(2):15. <https://doi.org/10.3390/biom8020015>

5. Kasahara M, Suetsugu N, Urano Y, Yamamoto C, Ohmori M, Takada Y, et al. An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system. *Scientific Reports*. 2016;6.

Article no. 39232. <https://doi.org/10.1038/srep39232>

6. Halls ML, Cooper DMF. Regulation by Ca<sup>2+</sup>-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(1). Article no. a004143. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004143>

7. Johnson JM, Reichelt M, Vadassery J, Gershenzon J, Oelmüller R. An *Arabidopsis* mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress. *BMC Plant Biology*. 2014;14(1). Article no. 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-162>

8. Hepler PK. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*. 2005;17(8):2142–2155. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508>

9. Ma SY, Zhao M. Calcium regulation of *Arabidopsis* salt resistance. *Acta Agronomica Sinica*. 2006;32(11):1706–1711.

10. Moeder W, Urquhart W, Ung H, Yoshioka K. The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity. *Molecular Plant*. 2011;4(3):442–452. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp018>

11. Strobel GA. Purification and properties of a phytotoxic polysaccharide produced by *Corynebacterium sepedonicum*. *Plant Physiology*. 1967;42(10):1433–1441. <https://doi.org/10.1104/pp.42.10.1433>

12. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Filinova NV, Dudareva LV. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method. *Plant Cell Reports*. 2011;30(1):125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>
13. Medvedev SS. Calcium signaling system in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005;52(2):249–270. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0038-1>
14. Willoughby D, Cooper DMF. Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological Reviews*. 2007;87(3):965–1010. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2006>
15. Schwartau VV, Virych PA, Makoveychuk TI, Artemenko AY. Calcium in plant cells. *Vestnik Dnepropetrovskogo universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya = Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology*. 2014;22(1):19–32. (In Russian) <https://doi.org/10.15421/011403>
16. Graskova IA, Borovskii GB, Kolesnichenko AV, Voinikov VK. Peroxidase as a component of the signaling pathway in potato cells during ring rot infection. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004;51(5):621–626. <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000040747.61131.a9>
17. Tanzarella P, Ferretta A, Barile SN, Ancona M, de Rasmio D, Signorile A, et al. Increased levels of cAMP by the calcium-dependent activation of soluble adenylyl cyclase in *parkin*-mutant fibroblasts. *Cells*. 2019;8(3):250. <https://doi.org/10.3390/cells8030250>
18. Witters E, Quanten L, Bloemen J, Valcke R, van Onckelen H. Product identification and adenylyl cyclase activity in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004;18(4):499–504. <https://doi.org/10.1002/rcm.1365>
19. Witters E, Valcke R, van Onckelen H. Cytoenzymological analysis of adenylyl cyclase activity and 3':5'-cAMP immunolocalization in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist*. 2005;168(1):99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01476.x>
20. Carricarte VC, Bianchin GM, Muschietti JP, Téllez-Iñón MT, Peticari A, Torres N, et al. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*). *The Biochemical Journal*. 1988;249(3):807–811. <https://doi.org/10.1042/bj2490807>
21. Moutinho A, Hussey PJ, Trevewas AJ, Malho R. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001;98(18):10481–10488. <https://doi.org/10.1073/pnas.171104598>
22. Ma W, Berkowitz GA. Ca<sup>2+</sup> conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytologist*. 2011;190(3):566–572. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03577.x>
23. Duszyn M, Świeżawska B, Szmidt-Jaworska A, Jaworski K. Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling—Current knowledge and perspectives. *Journal of Plant Physiology*. 2019;241. Article no. 153035. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153035>
24. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Krivolapova NV, Kopytchuk VN, Salyaev RK. Systemic activation of adenylate cyclase localized in the plasma membrane of potato cells during bacterial pathogenesis. *Doklady Akademii nauk*. 2007;413(3):420–423. (In Russian)
25. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Filinova NV. Plant adenylate cyclases: the effect of a biotic stressor on the kinetic parameters of transmembrane and “soluble” forms of adenylate cyclases. *Biologicheskie membrany*. 2014, vol. 31, no 2. pp.129–136. (In Russian)
26. Romanenko AS, Lomovatskaya LA, Shafikova TN, Borovskii GB, Krivolapova NV. Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides. *Journal of Phytopathology*. 2003;151(1):1–6. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0434.2003.00667.x>
27. Bianchet C, Wong A, Quaglia M, Alqurashi M, Gehring C, Ntoukakis V, et al. An *Arabidopsis thaliana* leucine-rich repeat protein harbors an adenylyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens. *Journal of Plant Physiology*. 2019;232:12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.025>
28. Pyatygin SS, Vodeneev VA, Opritov VA. Depolarization of plasma membrane as the universal primary bioelectnc response of plant cells to action of different factors. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2006;126(5):493–502. (In Russian)
29. Cooper DMF, Shell MJ, Thorn P, Irvine RF. Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(42):27703–27707. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27703>
30. Pittman JK. Vacuolar Ca<sup>2+</sup> uptake. *Cell Calcium*. 2011;50(2):139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.004>

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Филинова Надежда Владимировна**,  
к.б.н., научный сотрудник,  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН,  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,  
а/я 317,  
Российская Федерация,  
✉ e-mail: filinova@sifibr.irk.ru

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Nadegda V. Filinova**,  
Cand. Sci. (Biology), Researcher,  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS,  
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation,  
✉ e-mail: filinova@sifibr.irk.ru

**Ломоватская Лидия Арнольдовна,**  
д.б.н., профессор,  
ведущий научный сотрудник,  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН,  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,  
а/я 317,  
Российская Федерация,  
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

**Романенко Анатолий Сидорович,**  
д.б.н., профессор,  
главный научный сотрудник,  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН,  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,  
а/я 317,  
Российская Федерация,  
e-mail: rom@sifibr.irk.ru

**Заявленный вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад  
в подготовку публикации.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта  
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-  
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 19.10.2020.  
Одобрена после рецензирования 14.01.2021.  
Принята к публикации 30.08.2021.*

**Lidiya A. Lomovatskaya**  
Dr. Sci. (Biology), Professor,  
Leading Researcher,  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS,  
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation,  
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

**Anatoliy S. Romanenko**  
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,  
Chief Researcher,  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS,  
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: rom@sifibr.irk.ru

**Contribution of the authors**

The authors contributed equally to this article.

**Conflict interests**

The authors declare no conflict of interests re-  
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved  
by all the co-authors.*

*The article was submitted 19.10.2020.  
Approved after reviewing 14.01.2021.  
Accepted for publication 30.08.2021.*