Ozon ve Herbivorların Neden Olduğu Merkezi Metabolik Yanıtlar Fotosentezi ve Stoma Kapanmasını Etkiler

2016

Abstract

- Bitkiler, sürekli abiyotik ve biyotik stresör yelpazesini tolere etmelerine izin veren adaptifmekanizmaları geliştirmiştir.Troposferik ozon, küresel bir antropojenik kirletici, bitki-herbivore etkileşimlerini içeren canlı organizmaları ve ekosistemleri doğrudan etkiler. Bu çalışmada, Brassicanigra'nın (siyah hardal) O3'e ve herbivor Pierisbrassicae'ye ardışık olarak maruz kaldığı stres tepkilerini araştırdık. Transkriptomik ve metabolomik veriler O3 ve otçul yanıtları için çok değişkenli, korelasyon ve ağ analizleri kullanılarak değerlendirildi. O3 stres semptomları yaşlanmaya ve fosfat eksikliklerine benzerken, merkezi metabolizmada bir azalma, jasmonik asit / etilen yollarının indüksiyonu ve uçucu madde emisyonları dahil olmak üzere O3'ten herbivora indüklü karakteristik bitki savunma tepkilerine bir sıralı kayma olmuştur. Omics ağı ve yol analizleri, ozmotik stres cevabını ve stoma kapanmasını etkileyen gliserol ve merkezi enerji metabolizması arasında bir bağlantı öngörmüştür. Diğer fizyolojik ölçümler, O3 stresinin fotosentezi ve karbon asimilasyonunu inhibe ederken, ardışık olarak otçulların O3 tarafından indüklenen başlangıç tepkilerini etkilediğini ve tek başına herbivorlardan sonra gözlemlenen fenotipe neden olduğunu doğrulamıştır. Bu çalışma, bir bitki metabolizması sistemi üzerindeki çoklu stres etkileşimlerinin sonuçlarını açıklamakta ve ayrıca ekolojide ve bitki fizyolojisinde yeni hipotezler oluşturmak için omik verilerin nasıl entegre edilebileceğini göstermektedir.

- Doğal koşullar altında bitkiler sürekli olarak abiyotik ve biyotik strese maruz kalırlar.
- Küresel ısınma, dünyanın ortalama sıcaklığındaki artışlar ve atmosferin metan, karbondioksit (CO2) ve ozon (O3) gibi sera gazı içeriğindeki değişiklikler de dahil olmak üzere birbiriyle ilişkili abiyotik fenomenleri kapsamaktadır.
- Küresel iklim değişikliğinin,herbivor davranışı üzerindeki etkileri bitkilere verdiği zararı da arttırdığı tahmin edilmektedir.

Materyal ve Yöntem

- Brassica nigra tohumları, 3: 1: 1 oranında torf, kompost ve kum karışımı ile doldurulmuş plastik kaplarda tek tek dikildi.
- Sera koşullarında yetiştirildiler
- Bitkiler böcekler veya hastalıklar için kimyasal kontrol olmaksızın günde 5 saat püskürtme ile aralıklı olarak sulandı.
- Fideler haftada iki kez% 0.1 5-Superex ile gübrelendi (nitrojen: fosfor: potasyum, 19: 5: 20).
- Bitkiler 4 haftalık olduklarında ve yaklaşık yedi yaprak geliştirdiğinde, büyüme odalarına alındı ve 6 gün boyunca farklı uygulamalara tabi tutuldu.

- **B. nigra bitkileri için dört deney seti:**
- Pieris brassicae tırtıllar ve atmosferik havaya maruz kalma **(P)**
- O3 fümigasyonu **(O)**
- O3'ün ve onu takip eden herbivor uygulaması **(OP)**
- Kontroller **(C)**

- Deney, beş kez tekrarlandı ve her seferinde, uygulama başına üç bitki kullanıldı.
- Atmosferik hava ve P. brassicae beslemesine maruz bırakıldıktan sonra gen ifadesinin değerlendirilmesi için iki ilave replikat üretildi (toplamda yedi replikat).
- Takipeden deneyde, B. nigra yine C, O, P ve OP'de olduğu gibi ek olarak uzun süreli O3 fumigasyonu (OL) uygulandı.

Ozon Fumigasyonu

- Bitkiler (toplamda 12, uygulama başına üç) bitki büyüme odalarına taşındı. Odaların her biri bağımsız olarak kontrol edilen O3 konsantrasyonuna sahip olacak şekilde modifiye edilmiştir.
- Yüksek O3 odaları 4AM ile 8 PM arasında 70 nL L-1 olarak ve her gün kalan saatler için 30 nL L-1'lik O3 konsantrasyonunda tutuldu.
- Atmosferik hava için O3 konsantrasyonu 15 ila 20 nL L-1 arasında tutuldu.
- Odalar, 23 +/-3 ° C sıcaklıkta, gündüz % 60 ve gece % 80 nispi nemde , 16 saat aydınlık / 8 saat karanlıkta, 300 umol m-2s-1 ışık yoğunluğunda tutuldu.
- Bitkiler günlük sulandı. Yukarıdaki koşullar 5 gün sürdürüldü, bundan sonra 24 saat boyunca herbivora tabi tutuldu.
- Takip eden deneyde; 3 haftalık bitkilerde uzun süreli O3 fümigasyonu başlandı ve 16 gün boyunca devam etti.

Herbivor beslenmesi

- Pieris brassicae, yumurtlama için B. nigra bitkilerine bırakıldı ve ilk larva tırtıllar, 25 ° C'lik bir sıcaklıkla, bir iklim kontrollü böcek yetiştirme odasında, kuluçkadan hemen sonra toplandı.
- Herbivor muamelesi için, her bir bitkinin en geniş 3 yapraklarında (yaprak başına 10 tırtıl) toplamda 30 adet ilk P. brassicae tırtıl larvası konlmuş ve 24 saat boyunca beslenmiştir. 24 saat sonra (6.gün), VOC'lar (uçucu organik bileşik) toplandı ve metabolomik ve transkriptomik analizler için bitki örnekleri toplandı.

Fotosentez ve Gaz Değişiminin Fizyolojik Ölçümleri

- Yaprak dokularının nispi klorofil içeriği, en genç en geniş üç yapraktan (L5-L7) optik A653'ile ölçülerek belirlenmiştir.
- Hücre içi CO2 seviyeleri, stoma iletkenliği ve yaprak transpirasyonu yaklaşık bir saat boyunca tamamen genişlemiş bir yaprak üzerinde ölçüldü (L6).
- Ek olarak, yaprak L6 stoma iletkenliği, su buharı akışını yapraktan stoma ve çevreye doğru ölçen sabit durumdaki porometri ile belirlenmiştir.

Metabolomik ve Transkriptomik için örnekleme

- Örnekleme sırasında bitkiler 5 haftalıktı.
- Apeksten sayılarak, üç bitkinin her birinin üç en genç en geniş yaprakları (L5-L7) yaprak sapında keskin bir bıçakla kesilerek bir araya getirilmiştir.
- Bu yapraklar hemen alüminyum folyoya sarıldı ve sıvı nitrojen içinde dondurulduu.
- Yapraklar 280 ° C'de saklandı ve daha sonra sırasıyla metabolomik ve transkriptomik analizler yapıldı.

- Transkriptomik tarama, Arabidopsis CATMA versiyon 4 tüm genom mikrodizilerine dayanırken
- metabolomik tarama, kombine gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, sıvı kromatografi-kütle spektrometresi ve dinamik headspace örneklemesi ile toplanan uçucu organik bileşiklerin (VOC) GC-MS analizi
- Sekonder metabolitlerin analizi için, numuneler UHPLC-ESI / TOF-MS ile analiz edilmiştir

Transcriptome Yanıtları

- Hiyerarşik kümelenme ve 970 farklı eksprese edilen genlerin GO analizleri, O3 uygulamasını (O) herbivor stresinden (P) ve sıralı stresten (OP) ayırdı. GO ‘den sonra en güçlü tepkiyi gösteren ontolojik kategori, fotosentez ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri dahil olmak üzere enerji metabolizmasıydı. Genel olarak, O'da indüklenen gen ifadesindeki değişiklikler oldukça homojendir, P ve OP uygulamalarında meydana gelen değişiklikler daha zayıf bir korelasyon sergilemiştir.
- Işık hasatı ve karbon asimilasyonuna katılan genler, tüm stres senaryolarında, özellikle de O'da, aşağı regüle edildi. Ayrıca, fotokimyasal olmayan söndürme geninin NPQ1'in yukarı regülasyonu ile sonuçlandı.

- Sıralı uygulamada (OP), B. nigra, tek başına herbivor stresine bir cevaba benzeyen aktifleştirilmiş savunma yanıtları ;
- lipoksijenazlar LOX2 ve LOX3, tripsin inhibitörü WSCP ve mitojenle aktive olan protein kinaz MPK3'dı
- Özellikle, stres tepkileri ve fitohormon sinyallerine katılan genler, sadece O3 stresi ve herbivor uygulaması arasında farklı olarak düzenlenmiştir ve sadece O, kuraklık (MYB44), yaşlanma (EIN3) ve fosfat eksikliği gibi indüklenmiş abiyotik stres tepkileriyle ilişkili genlerdi.

Metabolom Yanıtları

- Metabolom profilinin çok değişkenli analizi, toplam metabolik varyasyonun% 65'ini ve uygulamanın etkilerinin% 95'ini açıkladı.
- Hem O3 hem de herbivor stresi dönüşü olmayan bitkilerin bazal metabolik durumunda değişime neden oldu.
- Bununla birlikte, herbivor, ardışık olarak OP uygulamasında O3'ün etkisini gölgede bıraktı.
- O'da artmış , P ve OP'de azalmış primer metabolit havuzlarında gözlenmiştir.
- Bununla birlikte, bu uygulamalara ortak bir cevap, prekürsör a-ketoglutarat ile kısmen ilişkili olan g-aminobutirik asidin 3-kat indüksiyonudur.
- En belirgin olarak, O'daki gliserol seviyeleri, kararlı durum değerinin% 155'ine yükseldi ancak OP'de eski haline geri döndü.

- Gliserofosfolipid yolunun başka bir metaboliti ve lipit zarlarının bir bileşeni olan etanolamin için benzer bir eğilim gözlendi
- Tüm uygulamalarda flavonoller ve sinamik asit ester türevleri gibi fenolik bileşikler artmıştır.
- Glukosinolat seviyeleri stabildi ya da azaldı (istisna olan glukorafanin), oysa glukosinolat türevleri ve yeşil yaprak uçucuları da dahil olmak üzere herbivore hasarı sonrası VOC'ler yayıldı.

Omics Bütünleştirici Ağ Korelasyon Analizi

- Transkriptomik ve metabolomik profiller, serbest ölçekli bir korelasyon ağına entegre edildi. Ağ, stres sinyalleşmesi, selüloz biyosentezi, kloroplast aktivitesi ve stoma regülasyonu gibi süreçlerde yer alan büyük merkezlerle birlikte, baskılandı.

TARTIŞMA

- B. brassgra'nın sıralı O3 stresine ve P. brassicae'nin otçul stresine verdiği yanıtlar sırasında fotosentez ve mitokondriyal aktivitenin düzenlenmesindeki değişikliklerin moleküler kanıtını bulduk.
- O3, fotosentezin ve stoma kapanmasının baskılanmasını indükledi, ancak bu yanıt,herivorlara ardışık olarak maruz kaldıktan sonra daha yüksek fotosentetik aktiviteye yönlendirildi. Omik çok değişkenli ve ağ analizleri kullanarak, gliserol metabolizmasını bu değişimin merkezi bir sürücüsü olarak tanımlanmıştır.
- Birleşik omik modelleri tarafından öngörüldüğü gibi , PO uygulaması sonrası stoma iletkenliği ve gaz değişimi, fotosentetik aktiviteyi ve enerji metabolizmasını etkileyen stratejik bir değişikliğin ortaya çıktığını doğruladı. PO stresine verilen bu tepki, tek başına stres tepkilerinden tahmin edilemezdi.

O3 Stresin Fotosentez ve Stomatal Düzenlemelere Etkileri

O3, kloroplastlardaki thylakoid membranları oksitler, klorofil degradasyonu ve erken yaprak yaşlanması ile sonuçlanır. Bununla birlikte, bu çalışmada gösterildiği gibi, ağarma ve kloroz semptomları ortaya çıkmadan önce, yaşlanma süreci, klorofil ve ışık hasat genlerinin aşağı regülasyonu ve yaprak senesansı EIN3'te yer alan transkripsiyon faktörünün indüklenmesi ile tam olarak başlatılabilir. Fotosentezi baskılamanın yanı sıra, 40 nL L21'in üzerindeki kronik O3 maruziyeti, O3'ün yaprağa girmesini önlemek için stoma kapanmasına neden olan bir reaktif oksijen türü (ROS) sinyal kasakadını tetikler. Bununla birlikte, bu süreç aynı zamanda CO2 alımını da sınırlandırmaktadır. Bizim çalışmamızda, O3'ün B. nigra stoma iletkenliği ve yaprak transpirasyonu üzerindeki olumsuz etkisi doğrulanmış ve kısa dönemde hücre içi CO2 düzeylerinin daha düşük olmasına neden olmuştur. Uzun süreli maruziyetten sonra (16 d için 70 nL L21 O3), yapraklarda ağarma ve kloroz belirtileri belirgin hale gelirken, azalmış stomatal iletkenlik ve düşük fotosentez oranları, stomatal kapanmayı güçlendirebilen hücre içi CO2 düzeyleriyle ilişkilidir.

- O3 stresi ayrıca, kuraklık ve yaralama gibi abiyotik ve biyotik streslere yanıtlarda karmaşık bir rol oynayabilen bir gen olan MYB44'ün ekspresyonunu da indüklemiştir. Arabidopsis mutantlarında MYB44 aşırı ekspresyonu, stoma kapanmasının regülasyonunu değiştirerek kuraklık toleransını arttırır. Bununla birlikte, MYB44 ayrıca stoma kapatılması, yaprak yaşlanması ve ROS temizlemede yer alan ABA tepkilerini de negatif olarak düzenlemektedir. Çalışmamızda, MYB44 ekspresyonu gliserol seviyeleri ile pozitif olarak ve Ca2 + sinyallemesi ile stoma kapatılmasında rol oynayan bir nitrik oksit bağlı guanil siklazın, NOGC1 ifadesi ile negatif korelasyon göstermiştir. Buna ek olarak, MYB44, LTPc2 (At2g45180) ile birlikte O3 stresi sırasında yukarı doğru düzenlenmiş olan ancak herbivor stresini önleyen kloroplastik lipit transfer proteini LTPc1 (At2g10940) ile pozitif olarak korelasyon göstermiştir. LTPlerin, hücre zarları arasında gliserolipidlerin transferinde aktif oldukları bilinmektedir. Bu sonuçlar, O3'e yanıt olarak MYB44 ve NOGC1'in koordine edilmiş bir düzenlemesini önermektedir; bu, ABA sinyallemesi ve stoma kapatılması için, osmotik stres tepkilerinde rol oynayan merkezi enerji metabolizmasını ve gliserolipid yollarını potansiyel olarak bağlayan bir geri bildirim mekanizması olarak hizmet edebilir.

- Güvenlik Valfleri Olarak Gliserol ve Enerji Metabolizmasının Önemi

Çalışmamızda fotosentezin ve klorofil düzeylerindeki azalmanın kombine baskılanması, gliserolün, kloroplastlar ve glikolipid membranların O3 stres ile indüklenen degradasyonundan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Artmış gliserol seviyeleri ayrıca stoma kapanışında ve ozmotik stres tepkilerinde (MYB44, NOGC1 ve FMO) yer alan genlerin ekspresyonundaki değişikliklerle de korele idi. Gliserol osmolitik özelliklere sahiptir ve gliserol kinaz eksikliği olan mutantlarda birikmesi Arabidopsis'te dehidratasyon stresine karşı direnci artırır. Ağ analizleri daha da ötesinde, ozmotik stres tepkileri, gliserol metabolizması ve kloroplastlar ve mitokondriyadaki merkezi enerji süreçleri arasındaki bağlantıyı vurguladı.

- O3 maruziyetinin mitokondriyal manganez süperoksit dismutaz MSD1 aktivitesini arttırdığını gözlemledik ve bu da mitokondrinin O3'e oksidatif stres cevabında rol oynadığını düşündürdü. Bu hipotez ayrıca mitokondriyal süksinat dehidrogenaz SDH1-1 ve G3P mekik (GPDHc1 / SDP6) aktivitesinin artmasıyla da desteklenmiştir. Mitokondriyal ETC'de, SDH1-1, kompleks II'de koenzim Q'nun bağlanma yeri olarak işlev görürken, G3P shuttla'ı, ETC'nin NADH'den türetilen redoks enerjisi ile beslenmesinde çok önemlidir. İlginç bir şekilde, bazı fosfat yanıt genlerinin (RNS1 ve PT2) O3 stresine yanıt olarak düzenlendiğini ve GO ağımızın bağlanmış gliserolipid metabolizmasını fosfat eksikliklerine (SQD2 ve DGD1) bağladığını bulduk.
- Genel olarak, çalışmamızda gözlemlenen gliserol metabolizmasının kümülatif regülasyonu, mitokondriyal aktiviteyi sürdürmek için B. nigra'da bir akı yeniden düzenlemesini yansıtabilir, bu da gliserolün yolakdaki bir ara metabolit olarak birikmesine yol açmıştır

- P. brassicae tarafından yapılan herbivor stresi O3 stresinden daha az şiddetli olmasına rağmen, fotosentezin azaltılmasına ve azaltılmış karbon asimilasyon oranlarına neden oldu.
- Herbivorların çiğnemesi, hasarlı yapraklara ve komşu dokularda fotosentez aktivitesini sistematik olarak azaltır, JA sinyal ve LOX'ları kloroplastlarda fotosentez ve ETC aktivitesini doğrudan etkiler.
- Biyolojik stres ve yaralanmadan sonra beklendiği gibi MYB44'ün herhangi bir yukarı regülasyonu gözlemlememesine rağmen, B. nigra'da herbivor kaynaklı kısmi stoma kapatılması gözlemlenmiştir. Her ne kadar O3 stresinin kendisi MYB44'ün yukarı regülasyonunu ve stoma kapanmasını tetiklese de, O3 stresi, herbivor stresinin ardından stomanın yeniden açılmasına neden olmuştur.

- Sonuç olarak, sıralı streslerden kaynaklanan fenotip, nispeten düşük stomatal iletkenlikle birlikte, tek başına herbivor hasarından sonra gözlemlenen benzerlik göstermektedir. Ardışık otçullar, MYC2'nin (JA sinyalleşmesi) ifadesini olumlu yönde indüklemiş ve O3 tarafından indüklenen EIN3 (ET sinyalleşme) ekspresyonunu olumsuz yönde etkilemiştir. MYC2 ve EIN3 bitki abiyotik ve biyotik stres yanıtlarının kilit entegratörleridir.
- karşılıklı etkileşimde, JA ile aktive edilen MYC2, EIN3 / EIL1'in transkripsiyonunu bastırırken, EIN3 / EIL1'in indüksiyonu, MYC2 ve JA yanıtlarını karşılıklı olarak bastırır. Benzer şekilde ET sinyallemesinde yer alan ve JA yanıtlarını pozitif olarak düzenleyen ERF2, tek başına O3 stresine maruz kaldıktan sonra aşağı regüle edildi, ancak herbivore stresi sırasında indüklendi. ABA ve JA / ET yollarının bu asimetrik düzenlemesi ve stomatal davranışla gözlenen ilişki, ardışık stres durumunda O3 ve otçullara metabolik tepkileri dengeleyen spesifik bir çapraziletişim olduğunu düşündürmektedir.