

УДК 579.887:576.5(045)

АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ ТА КАТАЛАЗИ КАЛЮСІВ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ, ІНФІКОВАНИХ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR. *GRANULUM* 118

Січкарь С. В., Коробкова К. С.

Активність пероксидази та каталази калюсів цукрового буряку, інфікованих *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. — С. В. Січкарь, К. С. Коробкова. — Досліджено зміни активності окислювальних ферментів калюсної культури клітин цукрового буряку при інфікуванні їх молікутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. Під час первинних контактів рослини і патогену відбувалося підвищення відносно контролю активності пероксидази на 49% і каталази на 38%. Через 5 годин після інфікування зареєстровано спад ферментативних активностей до 22% від контролю для пероксидази і 12% – для каталази, після чого показники не змінювались. Виявлені зміни активності окислювальних ферментів було пов'язано з індукуванням захисних механізмів клітин рослин у відповідь на стрес.

Ключові слова: окислювальні ферменти, калюси, молікути, стрес.

Адреса: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154, Київ, Україна; e-mail: ssichkar@ukr.net

Активність пероксидази і каталази каллусов сахарної свеклы, інфіцированих *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. — С. В. Січкарь, К. С. Коробкова. — Исследовано изменение активности окислительных ферментов каллусной культуры сахарной свеклы при инфицировании их молликутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. Во время первичных контактов растения и патогена происходило увеличение относительно контроля активности пероксидазы на 49% и каталазы на 38%. Через 5 часов после инфицирования зарегистрировано снижение ферментативных активностей до 22% от контроля для пероксидазы и 12% – для каталазы, после чего показатели стабилизировались. Показанные изменения активностей окислительных ферментов было связано с индуцированием защитных механизмов клеток растений в ответ на стресс.

Ключевые слова: окислительные ферменты, каллусы, молликуты, стресс.

Адрес: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, ул. Заболотного, 154, Киев, Украина; e-mail: ssichkar@ukr.net

Activity of peroxidase and catalase of sugar beet calluses infected by *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. — S. Sichkar, K. Korobkova. — The activity of oxidative enzymes from calluse culture of sugar beet infected by *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 was studied. In course of first contacts between plant cell and pathogen it was stated the activity increasing of peroxidase (on the 49%) and catalase (38%) relatively to control. After 5 hours of infecting it was registered the decreasing of enzyme activity to 22% and 12%, correspondently, and then these one become constantly. Demonstrated changes of oxidative enzymes activity were connected with induction of protective mechanisms of plant cell as the answer to stress.

Key words: oxidative enzymes, calluses, mollicutes, stress.

Address: Institute of microbiology and virology, NAS of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, Ukraine; e-mail: ssichkar@ukr.net

Вступ

Зараження рослин облігатними патогенами супроводжується збільшенням енергоємності клітинних процесів – підвищується інтенсивність дихання, що пов'язано з активацією ферментних систем пероксидази, каталази, поліфенолоксидази, які виконують функції термінальних оксидаз [3, 6, 7]. Захист біологічних молекул і клітинних органел здійснюється як ферментами, що каталізують біотрансформацію первинно виникаючих активних форм кисню (АФК), так і низькомолекулярними сполуками різної хімічної природи, що вступають в реакцію з АФК.

Синтез рослинами великої кількості хімічно і структурно різноманітних метаболітів є одним із засобів їх захисту проти патогенних мікроорганізмів, грибів, комах, стресів абіотичного походжен-

ня [3, 6, 9]. В інактивації активних форм кисню, що первинно виникають, беруть участь пероксидази і каталази [2, 15]. Досить широко вивчена пероксидаза, проте дані літератури щодо властивостей цього ферменту, вилученого з рослинних культур, суперечливі, а в деяких випадках – навіть протилежні. Це пов'язують з високою індукційною ферменту [4, 12]. Каталаза зустрічається в клітинах разом з пероксидазою (руйнує ту частину перекису водню, котра не може бути використана пероксидазою для окислювальних процесів), її роль полягає в захисті клітин від перекису водню, що утворився під час метаболізму та в забезпеченні рослин киснем [9, 12, 15].

Існують численні дані щодо вивчення окислювально – відновлювальних ферментів в умовах

окислювального стресу у рослин, інфікованих різними грибовими чи бактеріальними патогенами [9]. Проте, відомості щодо вивчення таких ферментів при інфікуванні рослин молікутами у доступній нам літературі відсутні.

Для вивчення багатьох фізіологічних і біохімічних процесів в рослинах, як модель, широко використовуються клітинні культури, котрі дозволяють адекватно оцінити обмінні процеси в клітинах рослин і їх відповіді на різноманітні впливи зовнішнього середовища в контрольованих умовах [3, 4]. Ми вважаємо, що система сумісного культивування патогена і клітин рослини-мішені є зручною моделлю при вивченні особливостей дії окислювальних ферментів клітин рослин у відповідь на мікоплазмову інфекцію [5].

У зв'язку із зазначеним вище, метою нашої роботи було вивчити вплив фітопатогенного молікута *A. laidlawii* var. *granulum* 118 на зміну активностей пероксидази і каталази клітин рослин в стандартних умовах *in vitro*.

Матеріали та методи

Дослідження проводили з використанням калюсних культур цукрового буряку (ЗК-51), люб'язно наданих старшим науковим співробітником відділу біотехнології Інституту цукрових буряків УААН В.І. Редько. Калюси вирощували на агаризованому середовищі Гамборга при температурі $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ і відносній вологості 70% [5]. Інокуляцію калюсів клітинами молікута *A. laidlawii* var. *granulum* 118, отриманого із Національної колекції мікроорганізмів України Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, проводили на 21 добу після пасажу рослинної культури. Молікути культивували на поживному середовищі СМ ІМВ-72 [5].

Активність пероксидази і каталази в тканинах досліджуваних зразків визначали мікрометодом, із застосуванням ферментативних реакцій у лунках мікротитрувальних планшет та подальшим спектрофотометричним визначенням концентрації продуктів реакції за методикою Сьюмки з співав. [11].

Активність пероксидази встановлювали за зміною оптичної густини дослідних зразків з використанням 96-канального планшетного спектрофотометра (Sumal PE-2 C.Zeiss) при довжині хвилі 450 нм, а активність каталази – при довжині хвилі 410 нм.

Кожний експеримент проводили тричі з використанням відповідних контролів. Коефіцієнт варіації середніх арифметичних з трьох вимірів не перевищував 5%. Графічні результати отримані з використанням комп'ютерних програм – прикладний пакет Microsoft Excel 2000.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз активності досліджуваних ферментів в клітинах калюсів за відсутності активних форм кисню – стресу, в стані фізіологічної норми (контроль) істотно не відрізнялися.

Максимальне підвищення активності пероксидази (рис. 1) відбувалось на 3-тю годину після інфікування, і складало 49% від контролю, після чого відбувався її спад. Через 5 годин після інфікування активність зазначеного ферменту знижувалась до 22% від контролю і в подальшому не змінювалась.

Дослідження каталазної активності калюсів цукрового буряку, інфікованих молікутами, показало, що пік її припадав на 3-тю годину після інфікування і складав 38% від контролю, з подальшим спадом (12%) до 5 години, і далі активність не змінювалась (рис. 2).

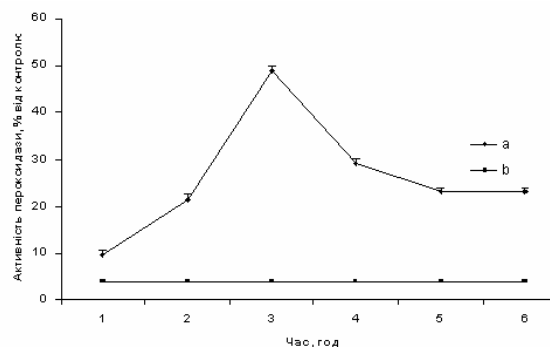


Рис. 1. Активність пероксидази клітин калюсів цукрового буряку під впливом молікутної інфекції: а – при інфікуванні *A. laidlawii* var. *granulum* 118; б – неінфіковані варіанти

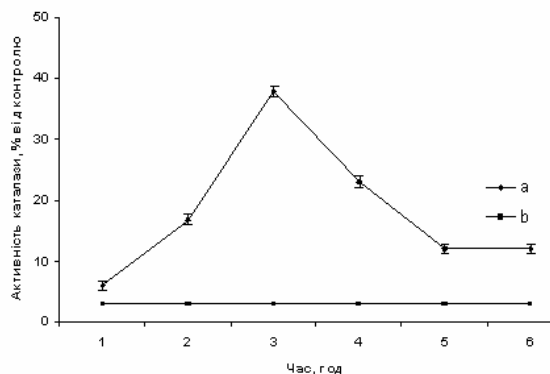


Рис. 2. Активність каталази клітин калюсів цукрового буряку під впливом молікутної інфекції: а – при інфікуванні *A. laidlawii* var. *granulum* 118; б – неінфіковані варіанти

Слід зазначити, що активність каталази була дещо нижчою за активність пероксидази – майже у 1,2 рази. Це закономірно, оскільки активність ферментів, що каталізують аеробне окислення дихального субстрату, під впливом інфекції змінюється. Як відомо, пероксидаза і каталаза знижують рівень перекису водню, який утворюється при каталітичних перетвореннях, і є біокатализаторами, що інактивуються продуктами реакцій [9, 13, 15]. Взаємодія і роль різних елементів антиоксидантного захисту у різних організмів може проявлятися по-різному. Так, спади кривої на графіках – інактивація активностей ферментів, – може відбуватися через підвищення активних форм кисню. Деякими авто-

рами показано, що деструкція каталази, чутливої до активних форм кисню, призводила до подальшого розвитку окислювального стресу [1, 7, 12].

Через 1,5–2 години після максимумів активностей ферментів спостерігали адаптацію інфікованих клітин калюсу до патогену, що відображалось поступово їх стабілізацією: до 22% від контролю для пероксидази і 12% від контролю для каталази.

Відомо, що окислювальний стрес характеризується порушенням балансу між антиоксидантами і прооксидантами в бік останніх і призводить до надлишкового генерування активних форм кисню. Патолофізіологи розглядають окислювально-відновлювальні процеси як механізми, що визначають біохімічну адаптацію рослинного організму до інфекції [9, 14].

В цей же час спостерігається повна відсутність мобілізації антиоксидантної захисної системи. Цей процес повинен був би супроводжуватися стабільним тривалим підвищенням активностей окислювальних ферментів, однак в наших дослідженнях спочатку відбувалося підвищення останніх, а потім їх зниження. Проте результати даної роботи не суперечать літературним даним за станом пероксидази і каталази при біотичних стресах. Вважають, що збільшення прооксидантів може бути сиг-

налом для зміни генної активності в клітині при стресах [2, 12, 15].

Висновки

Інфікування калюсів цукрового буряку клітинами фітопатогенної ахолеплазми призвело до стимулювання захисних реакцій клітин рослин – тимчасового збільшення на ранніх етапах активності ферментів пероксидази і каталази, що беруть участь в розвитку системної набутої чутливості. Це є підтвердженням даних Б.А. Рубіна з співав., які показали, що співвідношення активностей різних окислювальних систем має пристосувальне значення і може розглядатися як необхідна умова прояву стійкості рослин, при цьому склад ферментів системи антиоксидантного захисту і низькомолекулярних антиоксидантів у різних організмів може суттєво відрізнятись. [8]. Тож слід вважати, що вплив молікютів на рослинний організм є біотичним стресом, оскільки істотно зміщує рівновагу "антиоксиданти – прооксиданти" в бік останніх. В результаті окислювального стресу накопичуються активні форми кисню, котрі можуть виступати індукторами відповідних захисних механізмів в клітинах рослин.

1. Гесслер Н. Н., Леонович О. А., Рабинович Я. М., Рудченко М. Н., Белозерская Т. А. Сравнительное исследование компонентов антиоксидантной защиты в процессе роста мицелия дикого типа *Neurospora crassa* и мутантов *white collar-1* и *white collar-2* // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – 42, № 3. – С. 332–337.
2. Евтушенко Е. В., Сапрыкин В. А., Галицын М. Ю., Чекуров В. М. Влияние биологически активных веществ из хвойных на активность L-фенилаланин-аммоний-лиазы и пероксидазы в листьях пшеницы // Прикл. биохимия и микробиология. – 2008. – 44, № 1. – С. 123–128.
3. Кириллова Н. В. Изменение активности супероксиддисмутазы в каллусной культуре *Rauwolfia serpentina* Benth., выращенной в стандартных условиях и при температурном шоке // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – 40, № 1. – С. 89–93.
4. Комов В. П., Трошцкая Л. А., Кириллова Н. В. Выделение и очистка пероксидазы из каллусной культуры женьшеня // Прикл. биохимия и микробиология. – 1998. – 34, № 5. – С. 495–498.
5. Коробкова К. С., Онищенко А. М., Панченко Л. П., Мамчур О. Е., Дмитрук О. О., Редько В. І. Створення модельної системи *in vitro* для вивчення взаємодії фітопатогенних молікютів з клітинами рослин микоплазм // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 4. – С. 58–62.
6. Мишина Г. Н., Талиева М. Н. Изучение особенностей окислительного метаболизма возбудителя мучнистой росы флокса при взаимоотношениях с растением-хозяином // Облигатный паразитизм, цитофизиологические аспекты. – М.: Наука, 1991. – С. 65–73.
7. Озерецковская О. Л., Варламов В. П., Васюкова Н. И., Чаленко Г. И., Герасимова Н. Г., Панина Я. С. Воздействие системных сигнальных молекул на скорость распространения по тканям картофеля иммунизирующего эффекта элиситоров // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – 40, № 2. – С. 252–256.
8. Рубин Б. А., Арциховская Е. В., Аксенова В. А. Биохимия и физиология иммунитета растений. – М.: Высш. шк., 1975. – 318 с.
9. Серова З. Я., Подчуфарова Г. М., Гесь Д. К. Окислительно-восстановительные процессы инфицированного растения. – Минск: Наука и техника, 1982. – 230 с.
10. Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. – 1984. – 46, № 2. – С. 71–75.
11. Сюмка А. А. Внутрішньовидова мінливість *Cercospora Beticola* Sacc. та вдосконалення методів оцінки стійкості цукрових буряків до церкоспорозу : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 2007. – 20 с.
12. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – С. 53–133.
13. Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W. Reactive oxygen species and development of microbial eukaryotes // Trends in Microbiol. – 2005. – V. 13, № 3. – P. 11–118.
14. Patsonkis N., Georgion C. D. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators // Anal. Bioanal. Chem. – 2004. – V. 378, № 7. – P. 1783–1792.
15. Temple M., Perrone G., Dawes I. Complex cellular responses to reactive oxygen species // Trends in Cell Biol. – 2005. – V. 15, № 6. – P. 319–326.

Отримано: 23 травня 2010 р.

Прийнято до друку: 24 червня 2010 р.