

16. Risatti J.B., Capman W.C., and Stahl D.A. Community structure of a microbial mat: The phylogenetic dimension // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – **91**. – P. 10173.
17. Tebo B.M., Obratsova A.Y. Sulfate-reducing bacterium growth with Cr (VI), U (VI), Mn (IV) and Fe (III) as electron acceptors // FEMS Microbiology Letters. – 1998. – **162**. – P.193–198.
18. White C., Sayer J.A., Gadd G.M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination // FEMS Microbiol. Ecol. – 2000. – **33**. – P.197–208.
19. Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria / A.Balows, H.G.Truper, M.Dworkin, W.Harder and K.-H. Schleifer, eds. // The Prokaryotes, 2<sup>nd</sup> ed. – Berlin: Springer-Verlag, 1992. – **4**. – P. 3352–3378.
20. Pat. 6340596 B1 USA, Int. Cl. G 01 N 33/00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Sugiyama M.; assignee Fujirebio Inc. – N 09/248,316; fil. 02.11.1999; date of pat. 22.01.2002.

Отримано 19.05.2010

УДК 579.887:576.5(045)

**С.В. Січкач, К.С. Коробкова**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна*

## **АКТИВНІСТЬ ОКИСНЮВАЛЬНИХ ФЕРМЕНТІВ РОСЛИННИХ КЛІТИН ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МІКОПЛАЗМОЗУ**

*При інфікуванні калюсної культури клітин цукрового буряку фітопатогенним молекутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 показана зміна активності її окиснювальних ферментів. Максимальні показники активності зафіксовані через 3 год після інфікування відносно контролю і становили: для пероксидази 49 %, для каталази 38 % і для поліфенолоксидази 45 %. На 5-ту год після інфікування відбувається спад активностей ферментів до 22 % від контролю для пероксидази, 12 % – для каталази і 19 % – для поліфенолоксидази, після чого всі показники стабілізувались. Зміна активності компонентів антиоксидантного захисту клітин калюсів ймовірно була пов'язана з індукуванням захисних механізмів рослин у відповідь на проникнення патогенних молекул.*

*Ключові слова:* молекути, антиоксидантний захист, окиснювальні ферменти, калюси, стрес.

Синтез рослинами великої кількості структурно-різноманітних метаболітів є одним із засобів їх захисту проти патогенних мікроорганізмів, грибів, комах, стресів абіотичного походження [5, 9, 12]. В інактивній активних форм кисню, що первинно виникають, беруть участь пероксидази, каталази, поліфенолоксидази та ін. [2, 18]

Пероксидаза – один із найбільш широко розповсюджених ферментів в живих організмах (рослинні і тваринні тканини, гриби і бактерії). Пероксидаза має широку субстратну специфічність і каталізує окиснення багатьох хімічних сполук за рахунок розкладання перекису водню [6, 14]. Роль каталази полягає в захисті клітин від перекису водню, що утворився під час метаболізму та в забезпеченні рослин киснем. Каталаза діє в клітинах разом із пероксидазою і руйнує ту частину перекису водню, котра не може бути інактивована зазначеним ферментом [12, 14, 18].

Іншим акцептором електронів, що утворилися в гексозомонофосфатному шунті від НАДФ-Н є поліфенолоксидаза, яка каталізує окиснення монофенолів, наприклад, тирозину, фенолу, *n*-крезолу, 3,4 – диметилфенолу, а також взаємодіє з багатьма *o*-дифенолами і, навіть, трифенолом пірогалолом.

Досить широко досліджено окиснювально-відновлювальні ферменти в умовах окиснювального стресу у рослин, інфікованих патогенами грибною і бактеріальною етіологією [12], проте, відомості щодо їх активності при інфікуванні рослин молекутами недостатні.

Раніше було показано, що система сумісного культивування патогену і клітин рослини є зручною моделлю при вивченні особливостей дії окиснювальних ферментів рослинних клітин у відповідь на проникнення мікроорганізмів [5, 6, 7].

© С.В. Січкач, К.С. Коробкова, 2011

З огляду на викладене, мета нашої роботи полягала у вивченні змін активності окиснювальних ферментів – пероксидази, каталази і поліфенолоксидази рослинних клітин в умовах *in vitro* під впливом фітопатогенних молюсків.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили з використанням калюсних культур цукрового буряку (ЗК-51), які були люб'язно надані нам старшим науковим співробітником відділу біотехнології Інституту цукрових буряків УААН В.І. Редько. Калюсні культури вирощували на агаризованому середовищі Гамборга при температурі  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  і відносній вологості 70 %. Фітопатогенний молюск *Acholeplasma laidlawii var. granulum 118*, отриманий із Національної колекції мікроорганізмів України Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, культивували на поживному середовищі СМ ІМВ-72 [8]. Інфікування рослинної культури проводили на 21 добу після пасажу.

Активність пероксидази, каталази і поліфенолоксидази в тканинах досліджуваних зразків визначали мікрометодом, із застосуванням ферментативних реакцій у лунках мікротитрувальних планшет та подальшим спектрофотометричним визначенням концентрації продуктів реакції за методикою Сьюки з співав. [13]. Контролем були клітини калюсів, неінфіковані молюсками. Активності виражали у % відносно контролю.

**Визначення активності пероксидази** здійснювали наступним чином. У трек 96-канальної плоскодонної планшети (лунки А-1-Г-1) вносили по 100 мкл цитрат-фосфатного буферу. На крижаній бані розтирали у ступці 1г матеріалу проби у 10 мл цитрат-фосфатного буферу. Гомогенат центрифугували протягом 10 хв при 5000 g. Вносили у першу лунку 100 мкл супернатанту проби і робили пасаж розведень у всі наступні лунки треку по 100 мкл (від лунки А-1 до А-12).

Восьмиканальним автоматичним дозатором у кожну лунку вносили по 100 мкл субстрату – розчину тетраметилбензидин гідрохлориду. Заповнену планшету інкубували 30 хв. У лунках планшети з'являлося синє забарвлення зі зменшенням інтенсивності у зворотному порядку. Реакцію зупиняли внесенням у кожну лунку планшети 50 мкл 2 М сірчаної кислоти. Перебіг ферментативної реакції визначається візуально – за зміною забарвлення зразків у лунках мікротитрувальної планшети.

Визначення пероксидазної активності засноване на вимірюванні утворених забарвлених продуктів при дегідратації певних донорів водню. Активність пероксидази встановлювали за зміною оптичної густини дослідних зразків із використанням 96-канального планшетного спектрофотометра ( Sumal PE-2 C.Zeiss , Німеччина) при довжині хвилі 450 нм. Активність виражали у % відносно контролю.

**Визначення активності каталази** здійснювали за аналогічною схемою, що і визначення пероксидазної активності

В якості субстрату використовували 100 мкл 0,03 % розчин перекису водню. Після чого у кожну лунку вносили по 50 мкл розчину 2 % молібдату амонію. Реакцію зупиняли внесенням 50 мкл 1 М розчину HCl.

Перебіг ферментативної реакції фактично не виявляється візуально. Активність каталази визначали за зміною оптичної густини дослідних зразків із використанням 96-канального планшетного спектрофотометра при довжині хвилі 410 нм. Активність виражали у % відносно контролю.

**Визначення активності поліфенолоксидази.** Поліфенолоксидаза має оптимум активності при рН 5-7. При значеннях рН вище 7 активність не може бути виміряна через самоокиснення субстрату. При рН нижчому за 3 активність не проявляється. При визначенні активності ферменту використовують манометричний метод, використовуючи пірокатехін і *n*-крезол як субстрат [3].

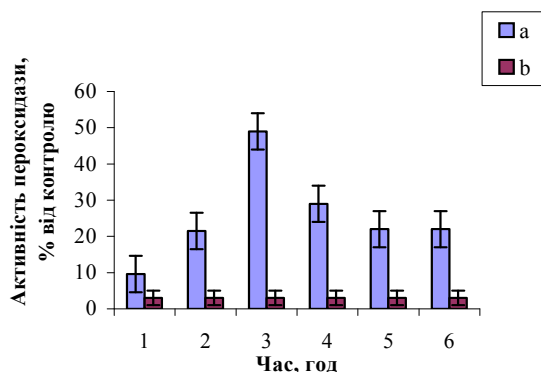
Визначення активності поліфенолоксидази здійснювали за такими етапами, як описано вище. Субстратом слугував розчин пірокатехіну, який вносили у кількості 100 мкл. Після чого, заповнену планшету інкубували 30 хв.

Перебіг ферментативної реакції визначається візуально – за зміною забарвлення зразків у лунках мікротитрувальної планшети. Таким чином можна спостерігати зміну градієнта активності ферменту.

Інструментально активність поліфенолоксидази встановлювали за зміною оптичної густини дослідних зразків із використанням 96-канального планшетного спектрофотометра (Sumal PE-2 C.Zeiss, Німеччина) при довжині хвилі 410 нм. Активність виражали у % відносно контролю.

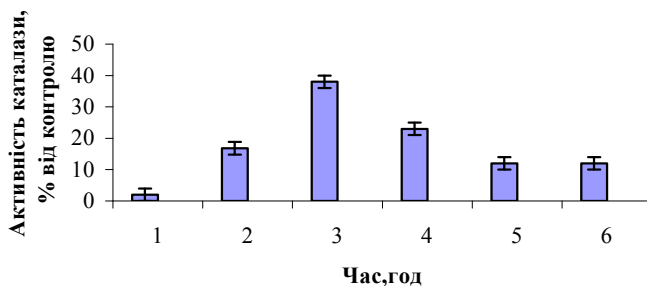
Кожний експеримент проводили тричі з використанням відповідних контролів, на графіках показано середнє арифметичне з трьох вимірів, коефіцієнт варіації котрих не перевищував 5 %. Графічні результати отримані з використанням комп'ютерних програм – прикладний пакет Microsoft Excel 2000.

**Результати та їх обговорення.** При дослідженні активності пероксидази клітин калюсів цукрового буряку (рис. 1) спостерігали її зростання на 3 год після інфікування, яке складало 49 % від контролю, після чого відбувався спад активності. Через 5 годин після інфікування активність зазначеного ферменту знижувалась до 22 % від контролю без змін у подальшому.



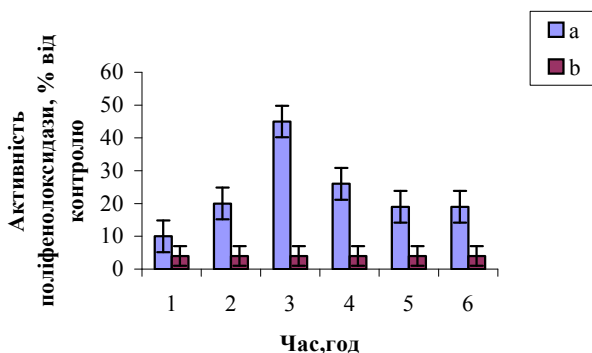
**Рис. 1.** Активність пероксидази клітин калюсів цукрового буряку під впливом молікутної інфекції: а – при інфікуванні *A. laidlawii* var. *granulatum* 118; б – неінфіковані варіанти.

Дослідження каталазної активності інфікованих ахолеплазною клітин калюсів цукрового буряку показало, що підвищення її рівня припадає на 3-тю годину після інфікування і складає 38 % від контролю, надалі рівень активності знижувався до 12 % (до 5 години) без змін у подальшому (рис. 2).



**Рис. 2.** Активність каталази клітин калюсів цукрового буряку під впливом молікутної інфекції.

При дослідженні змін активності поліфенолоксидази клітин калюсів, при їх інфікуванні *A. laidlawii* var. *granulatum* 118, спостерігали її підвищення у вигляді піку, яке відбувалося через 3 год після інфікування і складало 45 % від контролю. Надалі (через 5 год) активність ферменту знижувалась до 19 % від контролю, після чого залишалась стабільною (рис. 3).



**Рис. 3** Активність поліфенолоксидази клітин калюсів цукрового буряку під впливом молекулярної інфекції: а – при інфікуванні *A. laidlawii* var. *granulatum* 118; б – неінфіковані варіанти.

Слід зазначити, що активність каталази була дещо нижчою (майже у 1,2 рази) за активність пероксидази і поліфенолоксидази. Такий факт можна пояснити зміною активності ферментів каталізу аеробного окиснення дихального субстрату під впливом інфекції [1, 16].

Більш високі показники активності пероксидази порівняно з іншими окиснювальними ферментами узгоджуються з даними літератури відносно її більш широкого спектра дії: участь у різних реакціях метаболізму рослин – процесах фотосинтезу, катаболізмі фенольних сполук (окисненні флавоноїдів), лігніфікації клітинних стінок, а також загальних процесах біологічного окиснення [4].

З літератури відомо, що пероксидаза і каталаза знижують рівень перекису водню, який утворюється при каталітичних перетвореннях, і є біокаталізаторами, що інактивуються продуктами реакцій [12, 15, 18]. 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 авторами показано, що деструкція каталази, чутливої до активних форм кисню, призводить до подальшого розвитку окиснювального стресу [1, 10, 14].

Відомо, при будь-яких взаємодіях в клітинах живих організмів відбуваються зміни їх метаболізму, які супроводжуються виникненням значної кількості активних форм кисню, внаслідок запуску захисних реакцій рослини-хазяїна при окисненні фенолів пероксидазою і поліфенолоксидазою [8]. Вважають, що рання продукція  $H_2O_2$  є частиною “окиснювального вибуху” [16]. У наших дослідженнях через 1,5–2 години після максимумів активностей ферментів спостерігали адаптацію інфікованих клітин калюсу до патогену, що відобразалося поступовою їх стабілізацією: до 22 % від контролю для пероксидази, 12 % від контролю для каталази і 19 % від контролю для поліфенолоксидази.

В останні роки активно дискутується можливість участі окиснювально-відновлювальних ферментів у регуляторних процесах, а саме – в передачі сигналів, що забезпечують формування відповіді рослинної клітини на дію біотичних і абіотичних факторів. Було показано, що окиснювальний стрес характеризується порушенням балансу між антиоксидантами і прооксидантами в бік останніх і призводить до надлишкового генерування активних форм кисню. Тому окиснювально-відновлювальні процеси розглядають як механізми, що визначають біохімічну адаптацію рослинного організму до інфекції [12, 17].

З даних літератури відомо, що фенольні сполуки можуть бути сигнальними речовинами або індукторами генів вірулентності під час взаємодії мікро- і макросимбіонтів. Так, були показані суттєві зміни складу і кількості фенольних сполук в рослині при дії стресів оточуючого середовища, а саме, інфікуванні мікроорганізмами – так званих “патогенних атаках” [8]. При цьому спостерігається повна відсутність мобілізації антиоксидантної захисної системи. Вважають, що збільшення прооксидантів може бути сигналом для зміни генної активності в клітині при стресах [2, 14, 18].

Проведені нами дослідження показали, що при інфікуванні клітин калюсів фітопатогенною ахлеплазмою відбувається стимулювання захисних реакцій клітин рослин, тобто у них

збільшується рівень активності окиснювальних ферментів (пероксидази, каталази, поліфенолоксидази). Отже, можна вважати, що компоненти, які накопичуються внаслідок окиснювального стресу, можуть виступати індукторами відповідних захисних механізмів в клітинах рослин і можуть розглядатися як їх сигнальні метаболіти у міжклітинних взаємодіях із молікутами.

Частина експериментальної роботи виконувалась за участю кандидата біологічних наук А.А. Сюмки, за що автори висловлюють йому щирю подяку.

**С.В. Сичкар, К.С. Коробкова**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

## **АКТИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МИКОПЛАЗМОЗА**

Резюме

При инфицировании каллусной культуры клеток сахарной свеклы фитопатогенным молликутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 показано изменение активности их окислительных ферментов. Максимальные показатели активности зафиксированы через 3 часа после инфицирования относительно контроля и составляли: для пероксидазы 49 %, для каталазы 38 % и для полифенолоксидазы 45 %. Через 5 часов после инфицирования наблюдали снижение ферментативных активностей до 22 % от контроля для пероксидазы, 12 % – для каталазы и 19 % – для полифенолоксидазы, после чего все показатели стабилизировались. Изменение активности компонентов антиоксидантной защиты клеток каллусов, возможно, было связано с индукцией защитных механизмов растений в ответ на проникновение патогенных молликутов .

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

**S.V.Sichkar, K.S.Korobkova**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **ACTIVITY OF PLANT CELLS OXIDATIVE ENZYMES IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL MYCOPLASMOSIS**

S u m m a r y

Changes in activity of oxidative enzymes was shown when infecting the callus culture of sugar beet cells by phytopathogenic mollicute *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. Maximum indices of the enzyme activity were fixed 3 hours after infecting with regard to control: it was 49 % for peroxidase, 38 % for catalase and 45 % for polyphenoloxidase. The decrease of enzymatic activity to 22 %, 12 % and 19 %, respectively, was registered 5 hours after infecting, and after that all these indices became stabilized. Changes in the activity of components of antioxidative protection were probably connected with induction of plants' protective mechanisms in response to penetration of pathogenic mollicutes.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** mollicutes, antioxidative protection, oxidative enzymes, calluses, stress.

**The authors' address:** *Sichkar S.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

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. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат. Ленинградское отделение, 1987. – 430 с.
4. Карташова Е.Р., Руденская Г.Н., Юрина Е.В. Полифункциональность растительных пероксидаз и их практическое использование // С.-х. биология. – 2000. – № 5. – С. 63–70.

5. 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.
6. Комов В.П., Троицкая Л.А., Кириллова Н.В. Выделение и очистка пероксидазы из каллусной культуры женьшеня // Прикл. биохимия и микробиология. – 1998. – **34**, № 5. – С. 495–498.
7. Кругова Е.Д., Коць С.Я., Мандровская Н.М., Василюк В.Н. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в клубеньках и корнях сои, инокулированной Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 1(13). – С. 6-14
8. Коробкова К.С., Онищенко А.М., Панченко Л.П., Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Редько В.І. Створення модельної системи in vitro для вивчення взаємодії фітопатогенних молікутів з клітинами рослин мікоплазм // Мікробіол. журн. – 2009. – **71**, № 4. – С. 58–62.
9. 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.
10. Озерцовская 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.
11. Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. Биохимия и физиология иммунитета растений. – М.: Высш. шк., 1975. – 318 с.
12. Серова З.Я., Подчуфарова Г.М., Гесь Д.К. Окислительно-восстановительные процессы инфицированного растения. – Минск: Наука и техника, 1982. – 230 с.
13. Сюма А.А. Внутрішньовидова мінливість *Cercospora Beticola* Sacc. та вдосконалення методів оцінки стійкості цукрових буряків до церкоспору : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Киев, 2007. – 20 с.
14. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – С. 53-133.
15. Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W. Reactive oxygen species and development of microbial eukaryotes // Trends in Microbiol. – 2005. – **13**, N 3. – P. 11–118.
16. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. – 1997. – **48**. – P. 251–257.
17. Patsonkis N., Georgion C.D. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators // Anal. Bioanal. Chem. – 2004. – **378**, N 7. – P. 1783–1792.
18. Temple M., Perrone G., Dawes I. Complex cellular responses to reactive oxygen species // Trends in Cell Biol. – 2005. – **15**, N 6. – P. 31–326.

Отримано 29.04.2010

УДК 579.262

**Белюсов А.О., Козерецкая И.А.**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, кафедра общей и молекулярной генетики, ул. Владимирская 64, Киев, 01033, Украина*

## **СИМБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ ПРОЦЕССЫ РЕПРОДУКЦИИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

*Последнее десятилетие во всем мире активно изучаются цитоплазматические бактерии-симбионты, масштабы их распространения в природных и лабораторных популяциях хозяев; пути и способы их передачи в пределах одного вида и между филогенетически далекими видами; природа и механизмы их взаимодействия как между собой, так и со своими хозяевами; их эволюция и коэволюция. В любом исследовании особое место занимают модельные организмы, к коим, без сомнения, относится и *Drosophila melanogaster*. Среди эндосимбиотических бактерий плодовой мушки достаточно широко исследовались в последнее десятилетие только представители родов *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma*. Анализу этих работ и посвящен данный обзор.*

**Ключевые слова:** *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, эндосимбиотические бактерии, *Drosophila melanogaster*, фенотипические эффекты.

Бактерии-эндосимбионты всё больше и всё настойчивее привлекают внимание ученых различных специальностей по всему миру. Наибольший интерес представляют бактерии родов *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma*. Уже сейчас они поражают воображение своей не-

© Белюсов А.О., Козерецкая И.А. 2011