

*Л.П. Панченко, Е.С. Коробкова, А.Н. Остапчук*

## **ВЛИЯНИЕ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КАЛЛУСОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Акад. Заболотного, 154, Киев 03143, Украина, kkorobkova@ukr.net*

*Изучали влияние *Acholeplasma laidlawii* var. *granulatum* шт. 118 на состав жирных кислот каллусов сахарной свеклы. Установлено, что при воздействии ахолеплазмы наблюдаются изменения в количественном содержании отдельных жирных кислот, а также в качественном составе жирных кислот липидов каллусов. Изменение жирнокислотного состава липидов каллусов сахарной свеклы при инфицировании их *A. laidlawii* var. *granulatum* шт. 118 рассматривается как неспецифическая реакция на биогенный стресс.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: жирные кислоты, каллусы, стресс, *Acholeplasma*.*

В литературе имеются многочисленные данные о количественном и качественном составе липидов различных видов растений [7,9]. Считается, что липиды клеточных мембран играют важную роль в процессах адаптации и формировании устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды [3,8,11]. Исследуя роль вторичных метаболитов в физиолого-биохимических механизмах реакции на стресс, исследователями было установлено, что при снижении температуры внешней среды в тканях растений увеличивается содержание вторичных метаболитов, растет степень насыщенности жирных кислот [4,6]. В опытах на проростках пшеницы было продемонстрировано, что засоление среды вызывало повышение насыщенности жирных кислот [16]. Авторами было сделано предположение, что высокая насыщенность жирных кислот играет роль в адаптации растений к условиям засоления, уменьшая текучесть плазматической мембраны и, следовательно, ее проницаемость для ионов, в частности Na. Установлена зависимость текучести мембран от степени ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов бактерий, цианобактерий [13].

В последнее время в литературе особое внимание уделяется вопросам развития защитных реакций в каллусных культурах растений. Так, в ответ на инфицирование в каллусах выявлено повышение активности пероксидазы, увеличение содержания лигнина, что позволяет провести некую аналогию между реакциями, развиваемыми в растениях и каллусах в ответ на стресс. Каллусные культуры признаны удобной моделью для выявления способов регуляции устойчивости растений к стрессорам [7].

Микоплазмы растений достаточно широко распространены, но сведений о вовлечении липидов в процессы развития защитных реакций растений в доступной литературе нами не обнаружено.

Целью данной работы было изучение жирнокислотного состава липидов каллусных тканей различных генотипов сахарной свеклы в условиях бактериального стресса, вызванного *Acholeplasma laidlawii* var. *granulatum* шт. 118.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили клеточные

культуры ЗК-51, ЗК-43, СК-60/2 сахарной свеклы, любезно предоставленные канд. биол. наук, старшим научным сотрудником Института сахарной свеклы УААН В.И.Редько. Каллусы культивировали на агаризованной среде Гамборга и Эвелега при температуре  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности 70% [14]. Инокуляцию каллусов проводили на 14 сут после пассажа растительной культуры клетками *Acholeplasma laidlawii var. granulum* шт.118 (плотность культуры составляла  $5 \cdot 10^5$  кл/мл среды), полученной из Национальной коллекции микроорганизмов Украины и сохраняющейся в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины. Ахолеплазму культивировали на питательной среде СМ ИМВ-72 [10]. Отбор образцов каллусной ткани для анализа состава жирных кислот проводили на 5 сут после инфицирования их ахолеплазмой.

Для выделения общих липидов образцы каллусов (~ 2 г сырой массы) растирали в фарфоровой ступке до однородной массы в небольшом количестве (1-2 мл) хлороформа, гомогенат переносили в делительную воронку объемом 10 мл и экстрагировали липиды смесью хлороформ:гексан (1:1). Для получения метиловых эфиров жирных кислот к экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1,5%-ный раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в метаноле и прогревали в запаянных ампулах при  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 1ч. После охлаждения к полученной смеси добавляли воду ( $\frac{1}{2}$  объема смеси) и трижды экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот гексаном [9].

Состав метиловых эфиров жирных кислот каллусных культур анализировали с использованием газового хроматографа Hewlett - Packard 6890 и масс-спектрометра Hewlett - Packard 5973. Колонка капиллярная - HP-5MS, длина 30м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,50мкм. Температурный режим  $150\text{-}250^{\circ}\text{C}$ , градиент температуры  $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , газ-носитель – гелий, скорость потока через колонку 1,2 мл/мин. Температура выпаривания  $250^{\circ}\text{C}$  с делением потока 1:100. Метиловые эфиры идентифицировали по продолжительности времени удерживания их сравнительно со стандартами (Supelco). Содержание жирных кислот в процентах от общей площади пиков определяли с помощью программного обеспечения ChemStation. Для оценки ненасыщенности жирных кислот в липидах каллусных культур использовали индекс ненасыщенности:  $\text{ИН} = \sum P_j / 100$ , где  $P_j$  - содержание ненасыщенных жирных кислот, умноженное на число двойных связей в каждой кислоте [15]. В таблице представлены средние данные, полученные при обработке трех независимых экспериментов. Достоверность различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ( $P < 0,05$ ).

**Результаты.** Анализ жирнокислотного состава трех исследованных линий каллусов сахарной свеклы позволил идентифицировать кислоты с длиной углеродной цепи от  $\text{C}_{14:0}$  до  $\text{C}_{24:0}$  с различным количеством и положением двойных связей. Основную массу кислот липидов как интактных, так и инфицированных ахолеплазмой каллусов, составляли насыщенные жирные кислоты. Доминирующей среди них была гексадекановая ( $\text{C}_{16:0}$ ) кислота, доля которой в общей массе жирных кислот каллусов составила 45-65%. Относительно высокими были уровни ненасыщенных жирных кислот с 18 атомами углерода: олеиновой ( $\text{C}_{18:1}$ ) – до 12% и линолевой ( $\text{C}_{18:2}$ ) – от 6,58 до 21,14%. У исследованных линий сахарной свеклы обнаружены количественные и качественные отличия в составе жирных кислот. Так в липидах каллусных линий ЗК-43 и ЗК-51 не выявлена маргариновая кислота, в липидах каллусов линии СК-60/2 она присутствует, хотя количество ее не превышало 1,65 % (таблица).

В составе липидов каллусов сахарной свеклы нами идентифицированы насыщенные разветвленные жирные кислоты  $u-C_{15:0}$  -  $u-C_{17:0}$ , содержание которых составляет 3,96-11,69 % общего количества жирных кислот в липидах. При этом доминирует среди них 13-метилтетрадекановая кислота ( $u-C_{15:0}$ ) – до 7,25 %.

Как показали исследования, инфицирование каллусов ахолеплазмой оказывает влияние на общую картину спектров жирных кислот липидов, а также изменяет соотношение между ними. Так, в контрольных образцах каллусных линий ЗК-43 и ЗК-51 содержание гексадекановой кислоты составляло 39,62 % и 42,20 %, соответственно, в каллусах линии СК-60/2 – 61,22 %. В случае инфицирования в липидах каллусных линий ЗК-43 и ЗК-51 наблюдается увеличение содержания пальмитиновой почти в 1,3 раза, уменьшение в 2 раза количества стеариновой ( $C_{18:0}$ ) и некоторое снижение уровня линолевой ( $C_{18:2}$ ) кислот. В липидах каллусной линии СК-60/2, инфицированной ахолеплазмой, при сравнении с контрольными образцами наблюдали менее выраженные количественные изменения линолевой и насыщенных  $C_{16}$  и  $C_{18}$  – кислот. Так, количество линолевой кислоты уменьшалось на 1,96 %, пальмитиновой и стеариновой увеличивалось на 2,24 и 2,44 %, соответственно.

Отметим также, что суммарное количество разветвленных жирных кислот у инфицированных клеточных линий сахарной свеклы ЗК-43 и ЗК-51 уменьшается, по сравнению с контрольными образцами этих каллусов. Напротив, в случае инфицирования ахолеплазмой в липидах каллусной линии СК-60/2 процент разветвленных жирных кислот увеличивается в 1,4 раза.

Количество длинноцепочечных насыщенных жирных кислот: эйкозановой ( $C_{20:0}$ ), докозановой ( $C_{22:0}$ ) и тетракозановой ( $C_{24:0}$ ) в липидах каллусных линий сахарной свеклы ЗК-43, ЗК-5, СК-60/2 было незначительным и общее содержание их в контрольных образцах составляло 3,66, 3,71 и 3,75 %, соответственно. Инфицирование молликутом исследованных каллусов приводило к некоторому увеличению уровня этих кислот, а сумма их составила 4,04, 5,06 и 4,56%, соответственно.

В составе жирных кислот липидов исследуемых каллусов обнаружены два изомера  $C_{18:1}$ -кислоты. При этом обращает на себя внимание тот факт, что инфицирование каллусов сахарной свеклы культурой *A.laidlawii var.granulum* шт.118 влечет за собой изменения в количественном содержании *цис*- и *транс*- изомеров  $C_{18:1}$  – кислоты. Так, количество *цис*-октадеценовой кислоты в каллусных культурах ЗК-43 и СК-60/2 увеличивалось в 2,2 и 1,02 раза, соответственно, в клеточной линии сахарной свеклы ЗК-51 - уменьшалось в 1,47 раза. Содержание *транс*-октадеценовой кислоты в контрольных образцах исследуемых линий каллусов было незначительным и составило 1,10-1,84 % от суммы всех жирных кислот. Следует отметить, что в липидах каллусных тканей сахарной свеклы, инфицированных культурой *A.laidlawii var.granulum* шт.118, *транс*-октадеценовая кислота не обнаружена (таблица).

Нами установлено, что исследованные каллусы сахарной свеклы содержали гексадеценовую кислоту ( $C_{16:1}$ ) с метильной группой у 7 и 9 атома углерода. Количество этой кислоты, в зависимости от линии исследуемых каллусов, составляло 0,65-1,87 % общего содержания жирных кислот. По данным литературы, в большинстве растений гексадеценовая кислота выявляется как минорный компонент в общем составе липидов (1 %), лишь для отдельных видов растений она служит одной из главных (>10 %) жирных кислот [9].

Содержание жирных кислот (% от общей площади пиков) липидов каллусов сахарной свеклы (ЗК- 43, ЗК- 51, СК-60/2), инфицированных *Acholeplasma laidlawii var.granulum* шт.118\*

Жирные кислоты	ЗК- 43		ЗК- 51		СК-60/2	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
C14:0	-	-	-	-	1,42	1,65
C15:0	0,92	1,62	1,42	0,85	0,46	1,42
<i>и</i> - C15:0	6,39	7,25	6,73	5,32	2,24	2,72
C16:0	39,62	46,44	42,20	53,23	61,22	63,46
<i>и</i> - C16:0	1,29	1,65	1,67	0,87	1,02	1,20
C16:1 <i>цис</i> Δ7	1,87	-	1,71	0,75	1,20	0,65
C16:1 <i>цис</i> Δ9	0,70	0,97	1,87	1,04	1,86	1,84
<i>и</i> - C17:0	2,58	1,44	3,29	3,04	0,70	1,64
C18:0	8,93	3,84	8,15	4,30	10,14	7,70
C18:1 <i>цис</i> Δ9	11,06	12,04	7,49	7,88	6,35	6,50
C18:1 <i>транс</i> Δ9	1,84	-	1,57	-	1,10	-
C18:2 <i>цис, цис</i> Δ9, Δ12	21,14	20,71	20,19	17,66	8,54	6,58
C20:0	0,98	1,08	1,16	1,28	1,04	1,52
C22:0	2,00	1,79	1,49	1,64	0,86	1,0
C24:0	0,68	1,17	1,06	2,14	1,85	2,04
∑ насыщенных ЖК	63,39	65,28	67,17	72,67	80,95	84,63
∑ ненасыщенных ЖК	36,61	34,72	32,83	27,33	19,05	15,57
∑ <i>и</i> -ЖК	10,26	9,34	11,69	9,23	3,96	5,56
ИН	2,20	1,74	1,97	1,37	1,14	0,77

Примечание:\* - Во всех случаях статистическая ошибка не превышала 0,1 %;

ЖК – жирная кислота; C14:0 – цифра до двоеточия – число углеродных атомов, цифра после двоеточия – количество двойных связей в молекуле ЖК; Δ – положение двойной связи при отсчете от карбоксильного конца молекулы ЖК; *и* – изокализация метильной группы около предпоследнего атома углерода в молекуле ЖК; *цис* – изомеры с метильными группами, расположенными по одну сторону молекулы ЖК; *транс* – изомеры с диагональным расположением метильных групп в молекуле ЖК.

**Обсуждение.** Как следует из данных, представленных в таблице, доминирующей кислотой в составе липидов как инфицированных каллусов сахарной свеклы, так и контрольных, была пальмитиновая кислота. Высокий уровень пальмитиновой кислоты наблюдали в составе липидов каллусных тканей льна, женьшеня, табака, а воздействие внешних факторов незначительно изменяло ее количественное содержание [2]. Инфицирование ахолеплазмой, по нашим данным, оказало влияние на содержание пальмитиновой кислоты в липидах каллусных тканей сахарной свеклы. Так, в липидах линии СК-60/2 уровень ее увеличился на 2,24 %, ЗК-43 и ЗК-51 – на 6,82% и 11,03 %, соответственно. Увеличение уровня пальмитиновой кислоты в каллусах сахарной свеклы, инфицированных *A.laidlawii var.granulum* шт.118, возможно, связано со снижением активности десатуразы, субстратом которой служит АПБ (ацил-переносающий белок)-16:0, что, вероятно, можно рассматривать как защитную реакцию на биогенный стресс.

Уровень стеариновой кислоты в составе липидов каллусных тканей сахарной

свеклы снижался при инфицировании их *A.laidlawii var.granulum* шт.118. Снижение уровня  $C_{18:0}$  кислоты, с одной стороны, может быть связано с ее элонгацией с образованием длинноцепочечных  $C_{20:0}$ ,  $C_{22:0}$  и  $C_{24:0}$  кислот, а с другой – с ее десатурацией с образованием олеиновой кислоты [5].

Современные представления о регуляции адаптивных реакций растений в стрессовых условиях окружающей среды свидетельствуют о том, что трансформации липидных компонентов мембранных структур можно рассматривать как механизм продуцирования стрессового гормона - жасминовой кислоты или образования сигнальных интермедиатов, которые могут коррегировать метаболизм путем стимулирования транскрипции шоковых генов, экспрессии генов десатураз или других адаптационных механизмов [12].

Как следует из полученных нами данных, инфицирование каллусов сахарной свеклы клетками ахолеплазмы вызывало снижение общего содержания ненасыщенных жирных кислот и увеличение содержания насыщенных жирных кислот, что влекло за собой уменьшение индекса ненасыщенности. Обнаруженное уменьшение содержания ненасыщенных жирных кислот, вероятно, вызывается тем, что они являются главными субстратами в реакциях окисления перекиси, интенсивность которых усиливается при условиях стресса [1]. С другой стороны, уменьшение индекса ненасыщенности жирных кислот каллусных линий сахарной свеклы, инфицированных фитопатогеном, может быть связано также с изменениями активности ферментов десатураз, которые катализируют образование двойной связи [5].

Таким образом, полученные нами результаты изменения качественного и количественного жирнокислотного состава липидов каллусов сахарной свеклы, происходящие под влиянием инфицирования их культурой *A.laidlawii var.granulum* шт.118, позволяют рассматривать как неспецифическую реакцию на биогенный стресс.

**Панченко Л.П., Коробкова К.С., Остапчук А.М.**

*Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ*

## **ВПЛИВ МІКОПЛАЗМОВОЇ ІНФЕКЦІЇ НА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД КАЛЮСІВ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ**

### **Резюме**

Вивчали вплив *Acholeplasma laidlawii var.granulum* шт.118 на склад жирних кислот калюсів цукрових буряків. Встановлено, що при інфікуванні ахолеплазмою спостерігаються зміни кількісного вмісту окремих жирних кислот, а також якісний склад жирних кислот ліпідів калюсів. Зміни жирнокислотного складу ліпідів калюсів цукрових буряків при інфікуванні їх *A.laidlawii var.granulum* шт.118 розглядаються як неспецифічна реакція на біогенний стрес .

*Ключові слова:* жирні кислоти, калюси, стрес, *Acholeplasma*, молекути.

**EFFECT OF MYCOPLASMA INFECTION TO FATTY ACID COMPOSITION  
OF CALLUS CULTURE SUGAR BEET**

**S u m m a r y**

It was studied the effect of *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* str.118 to fatty acid composition of sugar beet calluses. It was established that acting of acholeplasma results to changes in the quantitative content of the individual fatty acids and in the qualitative composition of fatty acids in the lipids of calluses. The changing of the fatty acid composition of calluses lipids of sugar beet infected by *A. laidlawii* var. *granulum* str.118 is observed as nonspecific response to biotic stress.

*К е у w o r d s*: fatty acids, calluses, stress, *Acholeplasma laidlawii*, mollicutes.

1. Гречкин А.П., Тарчевский И.А. Липоксигеназная сигнальная система // Физиол.раст. – 1999. – **46**, №1. – С.132-142.
2. Давыдова И.М. Липиды и жирные кислоты в органах и недифференцированных каллусных тканях льна. Автореф. канд. биол. наук. – Киев, 1978. – 24 с.
3. Живетьев М.А., Граскова И.А., Дударева Л.В., Столбикова А.В., Войников В.К. Изменение жирнокислотного состава в растениях при гипотермической адаптации // Журнал стресс-физиологии и биохимии СО РАН(Иркутск). – 2010. – **6**, №4. – С. 51-65.
4. Ильинская Л.И., Озерецковская О.Л. Продукты липоксигеназного окисления жирных кислот как сигнальные молекулы в индуцированной устойчивости растений (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. – 1998. – **34**, №5. – С. 467-479.
5. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. – **41**. – С. 163-198.
6. Макаренко С.П., Константинов Ю.М., Шмаков В.Н., Коненкина Т.А. Жирнокислотный состав липидов каллусов двух видов сосны *Pinussibirica* и *Pinussylvestris* // Физиол.раст. – 2010. – **57**, №5. – С. 791-795.
7. Максимова Н.И., Мерзляк М.Н., Гусев М.В. Культура клеток и тканей в изучении взаимоотношений патогена и растения-хозяина // Биологические науки. – 1990. – №2. – С. 6-21.
8. Розенцвет О.А. Липидный состав растений как показатель их адаптивных возможностей к различным экологическим условиям // Автореф. д-р биол. наук. – Тольятти, 2006. – 436 с.
9. Синяк К., Хеден Г., Рихаге Р., Фри Г., Мэрде М. Газовая хроматография липидов клеток животных и возможности этого метода для идентификации лабораторных линий животных // Вопр. вирусол. – 1972. – №2. – С.228-235.
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. Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Светлова Н.Б., Мусієнко М.М. Жирні кислоти гліколіпідів хлоропластів у передачі стрес-сигналу та формуванні загальної адаптив-

- ної відповіді на посуху // Доповіді Національної академії наук України. – 2002. – №6. – С. 171-175.
12. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 296 с.
  13. *Cybulski L.E., Mansilla M.C., Aguilar P.S., D.deMendoza.* Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acil-lipid desaturase // Mol.Microbiol. – 2002. – **45**. – P. 1379-1388.
  14. *Gamborg O.G., Eveleigh D.E.* Culture methods and detection of glucanases in Cultures of wheat and barley // Canad.J.Biochem. – 1968. – **46**, №5. – P. 417-421.
  15. *Lyons J.M., Weaton T.A., Pratt Y.K.* Relationship between the physical nature of Mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants // Plant Physiol. – 1964. – **39**, №1. – P. 262-268.
  16. *Mansour M.M.F., Salama K.H.A., Al-Mutawa M.M., et al.* Effects of NaCl and Polyamines on plasma membrane lipids of wheat roots // Biol. Plant. – 2002. – **45**. – P. 235-239.

Отримано 10.02.2015