

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП, Д 03680, Украина

АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАК-ЛИАЗЫ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ИНФИЦИРОВАННЫХ АХОЛЕПЛАЗМОЙ

Изучено влияние *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт.118 на активность фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) в каллусах сахарной свеклы. Оптимальными условиями проведения ферментативной реакции были: использование в качестве субстрата L-фенилаланина, pH 8,4-8,8, температурный оптимум 38-40 °С. Установлено, что при заражении каллусной культуры сахарной свеклы фитопатогенным молликутом происходит временное возрастание активности ФАЛ, которое через 2 часа после инфицирования достигает максимального значения и, постепенно снижаясь, через 24 ч достигает первоначального уровня. Увеличение активности ФАЛ растения рассматривается как защитная реакция в ответ на действие патогена.

Ключевые слова: фенилаланин-аммиак-лиаза, каллусы, стресс, *Acholeplasma laidlawii*, молликуты.

Фенилаланин-аммиак-лиаза (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) является ключевым ферментом фенилпропаноидного биосинтеза и участвует в синтезе соединений, играющих важнейшую роль в индуцировании неспецифической устойчивости растений к стрессорам [2,5]. Фермент обратимо катализирует реакцию дезаминирования L-фенилаланина с образованием транс-коричной кислоты и аммиака. С этой реакции начинается синтез широкого спектра вторичных метаболитов: фенолов, фенилпропаноидов, мономеров лигнина, салициловой кислоты и других соединений, необходимых для развития растений и защиты их от неблагоприятных факторов среды [2,6,7,11].

Известно, что под воздействием различных стрессовых факторов активность ФАЛ в тканях растений может значительно изменяться за короткий промежуток времени [3,4,7,12]. Такими факторами могут быть механические повреждения, свет, влияние элиситоров и инфекция патогенными организмами. Учитывая высокую мобильность ФАЛ в ответ на разнообразные стрессоры и ее ключевую роль в синтезе соединений, принимающих участие в защитных реакциях, некоторые авторы считают, что данный фермент может служить маркером устойчивости к болезням растений [5,11].

Микоплазмы растений достаточно широко распространены, однако сведений о вовлечении ферментов фенольного обмена, в частности ФАЛ, в процессы развития защитных реакций растений при инфицировании микоплазмами в доступной нам литературе не обнаружено.

В связи с вышеизложенным, целью работы было изучение изменений активности фенилаланин-аммиак-лиазы каллусов сахарной свеклы, инфицированных ахолеплазмой.

Материалы и методы.

Эксперименты были выполнены в модельной системе *in vitro*, созданной на основе каллусов растений, инфицированных клетками фитопатогенных микоплазм [4]. Использовали клеточные культуры сахарной свеклы СК60/2, любезно предоставленные к.б.н., старшим научным сотрудником Института сахарной свеклы НААН Украины В.И. Редько. Каллусы культивировали на агаризованной среде Гамборга-Эвелега [14]. Инокуляцию проводили на 21 сутки после пассажа растительной культуры фитопатогенным молликутом *A. laidlawii* var. *granulum* шт.118 из Национальной коллекции микроорганизмов Украины, сохраняющейся в Институте микробиологии и вирусологии НАНУ. Ахолеплазму культивировали на питательной среде СМ ИМВ-72 [10].

В качестве источника ферментов использовали экстракт каллусной культуры сахарной свеклы. 1 г свежемороженого материала растирали в 5-кратном объеме (вес/объем) 0,1М Na-боратного буфера (pH 8,8), содержащего 1,0 М ЭДТА, 1,0 мМ дитиотрейтола, 25 мг/мл нерастворимого поливинилпирролидона ("Serva", Германия) [9]. Экстракцию выполняли в течение 40-60 мин при осторожном перемешивании на холоде. Полученный гомогенат центрифугировали при 4°C в течение 20 мин при 15000 g, осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали в качестве экстракта фермента. Содержание белка определяли по методу Бредфорда [13].

© Л.П. Панченко, Е.С. Коробкова, 2012

Активность ФАЛ определяли спектрофотометрически при 290 нм по образованию транс-коричной кислоты [15]. Реакционная смесь содержала 0,1 М Na-боратного буфера (рН 8,8), 1,0 мМ L-фенилаланина, D-фенилаланина или тирозина (“Serva”, Германия) (по условиям эксперимента) и экстракт ферментов (общий объем смеси 2 мл). Инкубацию проводили в течение 1 ч при температуре от 25 до 45 °С (согласно условиям эксперимента). Контролем служили пробы, в которых вместо экстракта добавляли боратный буфер. Реакцию останавливали добавлением в реакционную смесь 0,5 мл 1М ТХУ. Активность ФАЛ выражали в единицах оптической плотности (ΔE /мг белка).

Опыты проводили в трех повторностях. Графические результаты получены с использованием компьютерных программ – прикладной пакет Microsoft Excel 2000.

Результаты и их обсуждение. Для изучения изменений активности ФАЛ каллусной культуры сахарной свеклы, инфицированной ахолеплазмой, следовало оптимизировать условия проведения эксперимента – установить необходимое содержание L-фенилаланина как основного субстрата фермента, изучить ход реакции при внесении иных субстратов субстрате D-фенилаланина и L-тирозина, выявить наиболее благоприятные для активности ФАЛ показатели рН и температуры.

Изучение зависимости активности ФАЛ в каллусах сахарной свеклы, инфицированных *A. laidlawii var. granulum* шт.118, от содержания в реакционной смеси L-фенилаланина показало, что увеличение концентрации данного субстрата в испытуемой смеси значительно влияло на скорость ферментативной реакции (рис. 1).

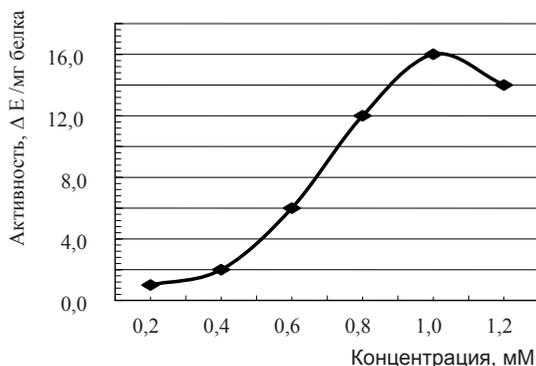


Рис. 1. Влияние концентрации L-фенилаланина на активность ФАЛ клеток каллусов сахарной свеклы, инфицированных *A. laidlawii var. granulum* шт.118.

Содержание L-фенилаланина, при котором проявлялась максимальная активность ФАЛ каллусных тканей сахарной свеклы, составляло 1,0 мМ. Именно это количество субстрата использовалось нами в дальнейшем при исследовании других свойств ФАЛ.

Исследование субстратной специфичности ферментного препарата из каллусов сахарной свеклы, инфицированных культурой фитопатогенного молликута, показало, что при внесении в реакционную среду D-фенилаланина или L-тирозина уровень активности ФАЛ инфицированных каллусов значительно ниже, чем при использовании в качестве субстрата L-фенилаланина (рис. 2). Так, в присутствии L-тирозина активность ФАЛ инфицированных каллусов составляла 5,3 (ΔE /мг белка), при наличии в реакционной среде D-фенилаланина – 3,1 (ΔE /мг белка), что, соответственно, в 2,8 и 4,9 раза ниже, чем при использовании в качестве субстрата L-фенилаланина. С учетом этого, в дальнейших исследованиях использовали лишь L-фенилаланин.

Изучение влияния на активность ФАЛ каллусов сахарной свеклы, инфицированных *A. laidlawii var. granulum* шт.118, различных значений рН реакционной смеси показало, что максимально высокая активность данного фермента наблюдалась при рН 8,4-8,8 (Рис.3). Температурный оптимум ферментативной реакции находился в интервале 38-40 °С (рис. 4).

Поскольку данные о влиянии фитопатогенных молликутов на активность ферментов пораженных ими растений являются недостаточными, то в нашу задачу входило изучить зависимость активности ФАЛ каллусов сахарной свеклы от продолжительности инфицирования их *A. laidlawii var. granulum* шт.118. В связи с этим, уровень активности фермента определяли через каждый час после инфицирования патогеном на протяжении 6 ч, а затем через 12, 24, 48, 60 ч с момента инокуляции каллусной культуры ахолеплазмой (рис. 5).

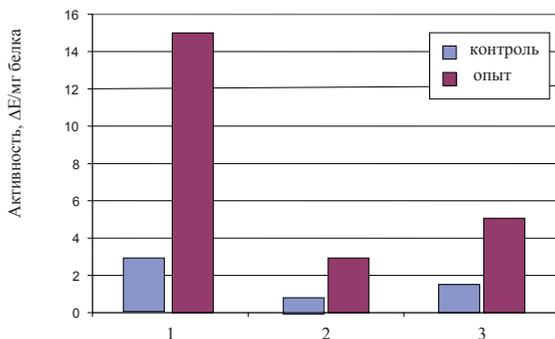


Рис. 2. Зависимость активности ФАЛ каллусов сахарной свеклы, инфицированных клетками ахолеплазмы, от различных видов субстрата; 1 - L-фенилаланин; 2 - D-фенилаланин; 3 - L-тирозин.

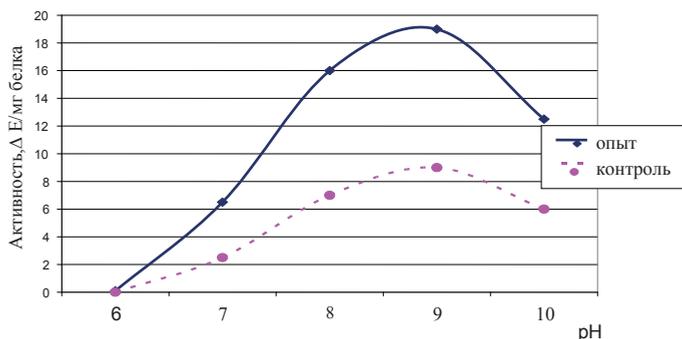


Рис. 3. Зависимость активности ФАЛ инфицированных ахолеплазмой каллусов сахарной свеклы от pH.

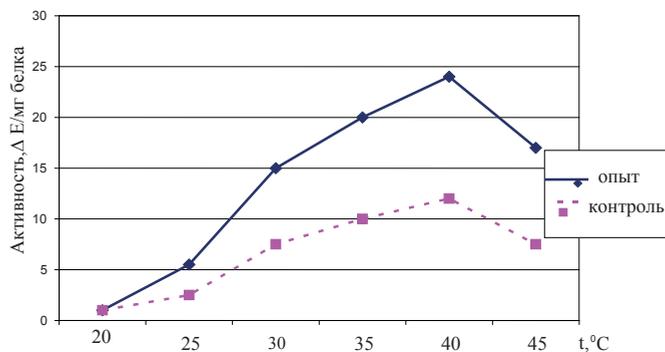


Рис. 4. Зависимость активности ФАЛ инфицированных ахолеплазмой каллусов сахарной свеклы от температуры.

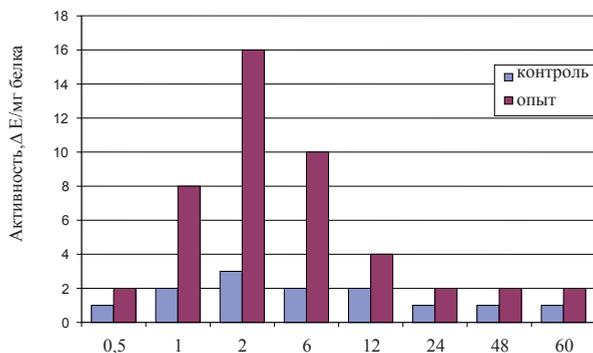


Рис. 5. Динамика активности ФАЛ в каллусах сахарной свеклы при инфицировании их *A. laidlawii* var. *granulum* шт 118.

Установлено, что активность ФАЛ каллусной культуры сахарной свеклы под воздействием молликута начинала возрастать уже через 1 ч после инфицирования, через 2 ч уровень ее увеличился в 4 раза по сравнению с контролем. При дальнейшем культивировании каллусов в присутствии патогена активность ФАЛ снижалась и через 6 ч культивирования лишь на 50 % превышал уровень активности неинфицированных образцов. Через 24 ч активность ФАЛ снижалась практически до начального уровня и оставалась неизменной в течение всего периода изучения (60 ч).

Таким образом, установлено, что при заражении каллусной культуры сахарной свеклы фитопатогенным молликутом *A. laidlawii var. granulum* шт.118 в оптимальных условиях происходит возрастание активности ФАЛ, которое достигает максимального значения в первые 2 часа после инфицирования.

Изучение фенилаланин-аммиак-лиазной активности в ферментных экстрактах из каллусов сахарной свеклы, инфицированных *A. laidlawii var. granulum* шт.118, показало, что такие характеристики исследуемого фермента как чувствительность к pH, температуре, субстрату согласуются с приведенными в литературе [1,3,8].

Динамика активности ФАЛ каллусных культур сахарной свеклы при инфицировании их *A. laidlawii var. granulum* шт.118 и, особенно, значительное увеличение ее активности в первые часы инокуляции, дает основание полагать, что в исследуемой культуре стимулируются защитные реакции в ответ на действие патогена. Известно, что при биотическом стрессе в тканях растений в результате изменения активности ФАЛ синтезируются и накапливаются фенольные соединения, которые повышают уровень сопротивляемости патогенным организмам [1,2,5,6]. При повреждениях и болезнях в растительных клетках активируется полифенолоксидаза, которая окисляет фенолы до высокотоксичных хинонов, убивающих инфицированные клетки. При этом инактивируются чужеродные экзоферменты и активируется синтез лигнина, откладывающегося в клеточных стенках пораженного растения и препятствующего проникновению и дальнейшему распространению патогена [1,11].

Следует отметить, что ранний пик активности ФАЛ отмечали и другие исследователи, например, у растений пшеницы [3,6,12]. Так, было показано, что обработка молодых листков пшеницы биопрепаратами, полученными из хвои и древесины различных видов хвойных деревьев, приводит к кратковременному повышению активности ФАЛ и пероксидазы – ферментов, причастных к развитию защитных реакций растений [3]. Имеются данные относительно изменения активности ФАЛ растений под воздействием биогенных элиситоров – хитозана и салициловой кислоты, иммуносупрессора – ламинарина, а также некоторых бактерий [2,3,5-7].

Существует мнение, что по уровню активности фенилаланин-аммиак-лиазы растительных клеток в ответ на воздействие возбудителей можно судить об устойчивости растения в целом к вызываемому им заболеванию [5,11]. Однако, в исследованиях Герасимовой с соавт. [2] отсутствие угнетения ламинарином синтеза ФАЛ в тканях клубней картофеля позволило авторам поставить под сомнение возможность использования данного фермента в качестве критерия индуцированной устойчивости.

Индукция защитных реакций была продемонстрирована также на каллусных культурах женьшеня при взаимодействии их с патогенным для человека микроорганизмом *Yersinia pseudotuberculosis*. [9]. В ходе исследований относительно влияния этих бактерий на разные линии клеточных культур женьшеня Персияновой с соавт. [9] было показано, что уже в течение первых суток культивирования *Y. pseudotuberculosis* индуцировали экспрессию защитных генов женьшеня, а именно, генов ФАЛ (Pg PAL1, Pg PAL2, Pg PAL3) и β -1,3-глюкана - Pg-glu1. При этом, в сравнении с контролем, экспрессия возрастала в 2-4 раза, повышение сохранялось и на третьи сутки воздействия иерсиний на каллусы. В наших же исследованиях повышение активности ФАЛ носило временный характер (до 24 ч). Вероятно, в ходе жизнедеятельности ахелеплазмы способны преодолевать защитные реакции клеток растения и избегать реакции сверхчувствительности, что, по всей видимости, и приводит к длительной персистенции фитопатогенных молликутов.

Таким образом, на модели паразит-хозяин в условиях *in vitro* впервые установлено непрочное повышение активности ФАЛ растительных клеток в ответ на проникновение фитопатогенной ахелеплазмы, что свидетельствует, с одной стороны, о включении растением

защитных реакций, и, с другой стороны, – вероятно, о способности молликутов преодолевать такие механизмы и переходить к персистирующему способу существования.

Л.П. Панченко, К.С. Коробкова

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

АКТИВНІСТЬ ФЕНІЛАЛАНІН-АМІАК-ЛІАЗИ У КАЛЮСНИХ КУЛЬТУРАХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ, ІНФІКОВАНИХ АХОЛЕПЛАЗМОЮ

Резюме

Вивчали вплив *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт.118 на активність фенілаланін-аміак-ліази (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) у калюсах цукрових буряків. Оптимальними умовами проведення ферментативної реакції були: використання як субстрата L-фенілаланіну, рН 8.4-8.8, температурний оптимум 38-40°C. Встановлено, що при зараженні калюсної культури цукрового буряку фітопатогенним молікутом відбувається тимчасове зростання активності ФАЛ, яке через 2 год після інфікування досягає максимального значення и, поступово знижуючись, через 24 год досягає початкового рівня. Збільшення активності ФАЛ рослини розглядають як захисну реакцію у відповідь на дію патогена.

Ключові слова: фенілаланін-аміак-ліаза, калюси, стрес, *Acholeplasma laidlawii*, молікути.

L.P. Panchenko, K.S. Korobkova

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

ACTIVITY OF PHENYLALANINE-AMMONIA-LYASE IN CALLUS CULTURES OF SUGAR BEET INFECTED BY ACHOLEPLASMA

S u m m a r y

The effect of *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 on activity of phenylanine- ammonia-lyase (PAL) in callus cultures of sugar beet was researched. The optimal conditions of enzyme reaction were: using the L-phenilalanine as a substrate, pH 8.4-8.8, the temperature optimum 38-40° C. It was established that at the infecting of sugar beet callus culture by phytopathogenic mollicute the PAL activity was temporarily increased and reached its maximum after 2 h of infecting. Then it gradually decreased and in 24 h reached its initial level. An increase of PAL activity of plant is considered as protective reaction in response to the action of pathogen.

The paper is presented in Russian.

К e y w o r d s: phenylanine-ammonia-lyase, calluses, stress, *Acholeplasma laidlawii*, mollicutes.

The author's address: *Panchenko L.P.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. *Адамовская В.Г., Молодченкова В.Г., Цигельская Л.И., Безкровная Л.Я.* Изменение активности фенилаланин-аммиак-лиазы, суммарного содержания фенольных соединений и лигнина в проростках ярового ячменя при действии фузариозной инфекции // *Вісник Харківського Національного аграрн. у-ту. Серія біологія.* – 2007. – вип.1(10). – С.50–58.
2. *Герасимова И.Г., Придворова С.М., Озерецковская О.Л.* Участие фенилаланин-аммиак-лиазы в индуцированной устойчивости и восприимчивости картофеля // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 2005. – **41**, №1. – С.117–120.
3. *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.
4. *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 микоплазм // *Мікробіол. журн.* – 2009. – **71**, № 4. – С. 58–62.
5. *Озерецковская О.А.* Индуцирование устойчивости растений биогенными элиситорами фитопатогенов // *Микология и фитопатология.* – 2004. – **30**. – С.325–339.

6. Олениченко Н.А., Загоскина Р.В. Ответная реакция озимой пшеницы на действие низких температур: образование фенольных соединений и активность L-фенилаланин-аммиак-лиазы // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005 – **41**, №6. – С.681–685.
7. Паду Э.Х. Свойства пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы // Физиология растений. – 1995. – **42**, №3. – С.408–415.
8. Панина Я.С., Герасимова Н.Г., Чаленко Г.И. и др. Салициловая кислота и фенилаланин-аммиак-лиаза в картофеле, инфицированном возбудителем фитофтороза // Физиология растений. – 2005. – **52**, №4. – С.573–577.
9. Персиянова Е.В., Киселев К.В., Булгаков В.П., Тимченко Н.Ф., Чернодод Г.К., Журавлев Ю.Н. Индукция защитных реакций в каллусных культурах женьшеня при взаимодействии с патогеном человека *Yersinia pseudotuberculosis* // Физиология растений. – 2008. – **55**, № 6. – С.554–562
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. Тютерев С.Я. Научные основы индуцированной болезни-устойчивости растений. // С.-Петербург: Изд-во ВИЗР. — 2002. — С.167—175.
12. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Активность фенилаланин-аммиак-лиазы и ингибиторов протеолитических ферментов в проростках пшеницы при септориозе // Физиология и биохимия культур растений. – 2000. – **32**, №3. – С.223–229.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **71**, № 2. – P. 248–254.
14. Gamborg O.G., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Canad.J.Biochem. – 1968. – **46**, N5. – P.417–421.
15. Zucker M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tubers tissue // Plant Physiol. – 1965. – **40**. – 779–784.

Отримано 17.05.2011