

УДК 581.19: 577.15

О. А. САПКО, А. Ш. УТАРБАЕВА, С. МАКУЛБЕК, Р. М. КУНАЕВА

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКЗОГЕННОЙ H_2O_2 АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ШТАММОВ ГРИБА *FUSARIUM SOLANI* С КОНТРАСТНОЙ ПАТОГЕННОСТЬЮ

(Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхояжина ЦБИ КН МОН РК)

Проанализировано состояние функциональной активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), аскорбатпероксидазы (АПО) у патогенного и непатогенного штаммов гриба *Fusarium solani* в цикле выращивания на питательной среде. Показана специфичность локализации и уровней конститутивной активности ферментов, связанная с патогенностью гриба. Изучено влияние экзогенной H_2O_2 на активность экстрацеллюлярных и связанных с мицелием форм ферментов антиоксидантной системы. Для патогенного штамма установлена быстрая обратимая индукция внеклеточных форм СОД и пролонгированная индукция цитоплазматических форм КАТ мицелия. У непатогенного штамма H_2O_2 вызывала быструю супрессию экстрацеллюлярных и мицелиарных форм СОД и АПО.

При взаимодействии фитопатогенных грибов и растений одной из ранних стрессовых реакций клеток является образование ряда активных форм кислорода (АФК): супероксидного анион-радикала (O_2^-), пероксида водорода (H_2O_2), гидроксильного радикала (ОН) и других [1, 2]. Окислительный взрыв запускается элиситорами, биологическими индукторами защитных реакций растений. Этим свойством обладают многие метаболиты фитопатогенных микроорганизмов, в частности грибов. Не так давно показана возможность обратной последовательности событий, а именно, индукция элиситорной активности под действием АФК [3].

Из-за высокой реакционной способности АФК могут повреждать любые макромолекулы (липиды, ДНК и белки). Однако в нормальных условиях наличие антиоксидантной защиты позволяет клеткам поддерживать внутриклеточную концентрацию оксидантов на безопасном уровне. В то же время, в низких концентрациях АФК способны участвовать в регуляции различных клеточных функций эукариот, таких как пролиферация, окислительный взрыв, апоптоз и другие. Наряду с токсическим, регуляторное действие АФК является неотъемлемой частью патологических состояний [4].

Важную роль в защите клеток и тканей от окислительных повреждений и поддержания нормального редокс-баланса играют системы естественной детоксикации, в том числе специализированные ферментные антиоксиданты: супер-

оксиддисмутаза, каталазы, ферменты аскорбат-глютатионового цикла [5]. Антиоксидантные системы являются необходимым противовесом АФК и защищают организм от чрезмерного окислительного стресса. Для патогенных микроорганизмов это особенно важно, так как они подвергаются действию не только «собственных», но и образованных хозяином АФК. Если паразит использует разрушительную силу АФК для деструкции тканей хозяина, он тем более должен обладать достаточно мощным антиокислительным аппаратом для собственной защиты.

Особую роль в регуляции клеточной активности играет перекись водорода. Это связано с тем, что H_2O_2 относительно стабильна, генерируется клетками как побочный продукт метаболизма и легко проникает через биологические мембранны, что позволяет ей участвовать как во внутриклеточной, так и в межклеточной сигнализации [6]. Роль пероксида водорода как вторичного мессенджера была подтверждена во многих случаях, связанных с экспрессией генов, контролирующих синтез антиоксидантных ферментов, а также синтез аскорбата и глютатиона [7]. Наиболее полно механизмы, с помощью которых клетка регулирует уровень оксидантов и активирует системы антиоксидантной защиты, изучены у дрожжей и бактерий [8, 9].

Сухая фузариозная гниль является распространенным заболеванием клубней картофеля в период хранения. Это заболевание распространено повсеместно, где выращивается картофель [10].

В процессе разложения картофельной ткани при проявлении фузариозной гнили определяющую роль играет пектинтрансэлиминаза грибов *F.solani*, *F.cultorum*, *F.aenaceum* и других видов. Виды *F.solani*, *Foxysporum* и *F.semitectum* производят гидролитические ферменты пектинмембранный эстеразу, полигалактуроназу, пектиндеполимеразу целлюлазу, которые также рассматриваются как факторы патогенности [11]. Роль АФК и антиоксидантных ферментов в формировании патогенности гриба *F. solani*, механизмы регуляции этих процессов, малоизученны.

Целью настоящей работы было изучение функциональной активности антиоксидантных ферментов СОД, КАТ, АПО и механизмов ее регуляции пероксидом водорода, важным компонентом АФК и регулятором клеточной активности у патогенного и непатогенного штаммов гриба *F. solani*.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования служили штаммы гриба *F. solani* F-RKM 0166 (патогенный) и F-RKM 0167 (слабо патогенный), полученные из Республиканской коллекции микроорганизмов. Гриб культивировали на жидкой модифицированной среде Чапека [12], дополненной картофельным отваром. Культуры выращивали при комнатной температуре, в 500 мл конических колбах без перемешивания (объем культуральной среды 200 мл). Для опыта использовали 16-дневные культуры, на стационарной стадии роста гриба. H_2O_2 добавляли непосредственно в среду культивирования при тщательном перемешивании (диапазон концентраций 0,5-2,0 мМ).

Активность внеклеточных форм ферментов анализировали, добавляя необходимый объем культурального фильтрата к 0,05 М Трис/HCl-буферу, pH 7,8, содержащему 1 мМ Na_2EDTA , 3 % (вес/объем), растворимого поливинилпирролидона (буфер выделения). Мицелий гомогенизировали в 0,05 М Трис/HCl-буфере, pH 7,8 (буфер выделения). Взвесь центрифугировали при 10 000 g, 20 минут, ферменты анализировали в супернатанте. Все операции проводили при 40°C.

Активность КАТ определяли спектрофотометрически по распаду H_2O_2 при 240 нм в Na-фосфатном буфере (pH=6,5). Реакционная смесь содержала 2 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH=6,5), 100 мкл H_2O_2 (конечная концентрация 12,5 мМ),

50 мкл анализируемого образца. Коэффициент экстинкции H_2O_2 при 240 нм 0,040 мМ⁻¹ см⁻¹ [13].

Активность АПО определяли спектрофотометрически по разложению аскорбиновой кислоты при 290 нм в Трис-HCl буфере (pH=7,8). Реакционная смесь содержала 2 мл 0,2 М Трис-HCl буфере (pH=7,8), 100 мкл 5,6 мМ аскорбиновой кислоты, 100 мкл 11,25 мМ H_2O_2 , 100 мкл анализируемого образца. Коэффициент экстинкции аскорбиновой кислоты при 290 нм 2,8 мМ⁻¹ см⁻¹ [14].

Суммарную активность СОД определяли в реакции конкурентного восстановления тетразоляния нитросинего согласно методу [15]. Активность фермента определяли, используя 50 мМ К-фосфатный буфер (pH 7,8), содержащий 0,1 мМ Na_2EDTA , 150 мкМ нитроблютетразолиум (НБТ) и 26 мМ метионин. Реакцию запускали добавлением к 180 мкл 150 мкМ НБТ и 5-10 мкл супернатанта 180 мкл 8 мкМ рибофлавина с последующей инкубацией на свету (лампа дневного света, 33 Вт) в течение 20 мин. В качестве контроля служила смесь, не содержащая анализируемого образца (максимальный уровень образования формазана). Измерение оптической плотности проводили при 560 нм. За единицу активности принимали 50% ингибирования образования формазана.

Белок определяли микробиуретовым методом [16]. Опыты проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. Результаты статистически обработаны согласно [17].

Результаты и их обсуждение

Генерация активных форм кислорода (АФК) является ключевым компонентом клеточных взаимодействий растения и патогена, образование и утилизация которых происходит с участием антиокислительных ферментных систем [18]. Зачастую возможный вклад гриба в формирование суммарного редокс-статуса системы хозяин-патоген даже не рассматривается, хотя получены четкие свидетельства вклада в общую с растением продукцию АФК для грибов, производящих АФК вне растения [3].

Проведено сравнительное изучение исходной функциональной активности антиоксидантных ферментов патогенного (F1) и непатогенного (F2) штаммов *F.solani*. Анализировали активность внеклеточных и цитоплазматических мицелярных форм ферментов в динамике роста гриба в цикле

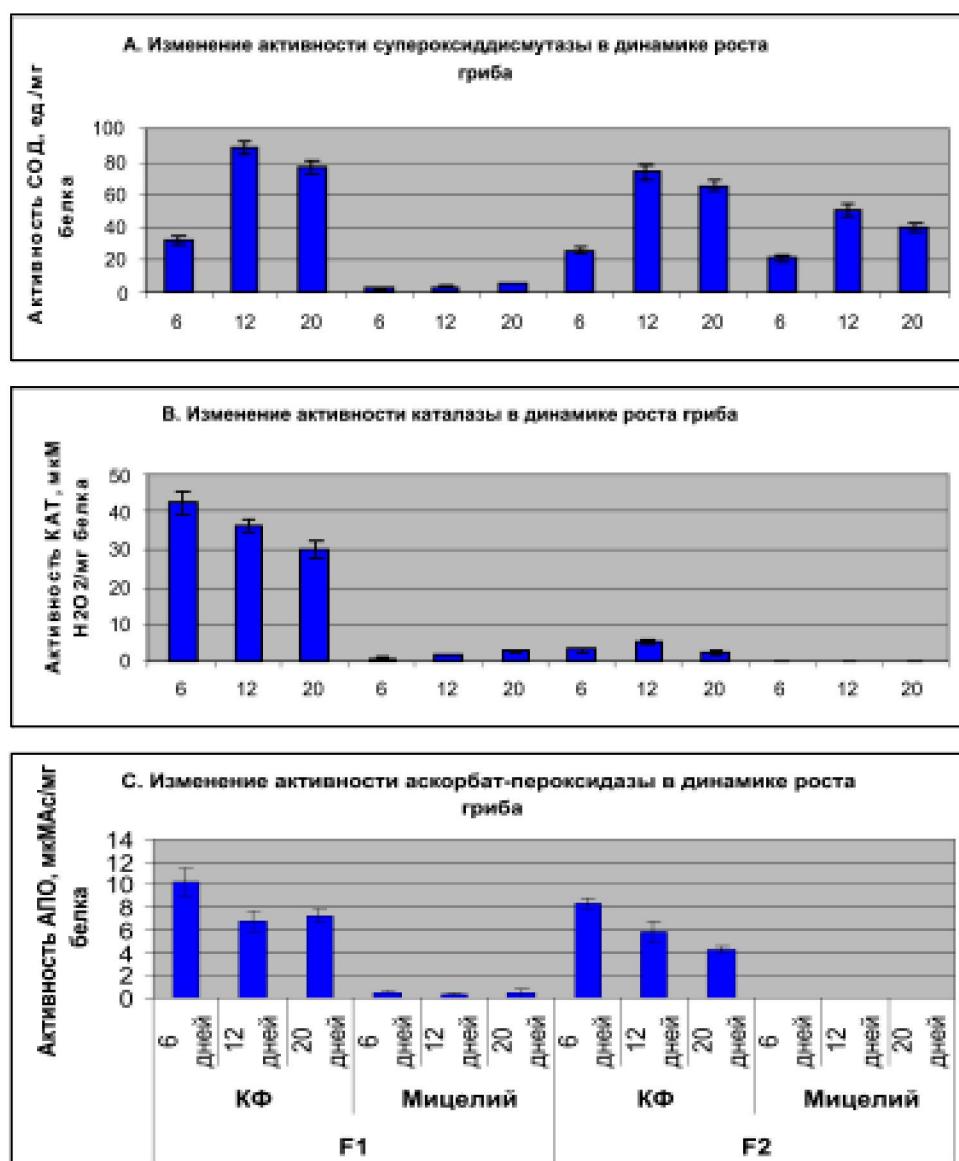


Рис. 1. Активность антиоксидантных ферментов внеклеточных (КФ) и цитоплазматических форм мицелия (Мицеллий) патогенного (F1) и непатогенного (F2) штаммов гриба *F.solani* в цикле выращивания на питательной среде

выращивания на питательной среде Чапека. Штаммы гриба с различной патогенностью заметно отличались друг от друга по локализации и уровням функциональной активности антиоксидантных ферментов (рис. 1, А-С).

У патогенного штамма активность СОД практически полностью была локализована в экстрацеллюлярной фракции и активность цитоплазматической СОД мицелия составляла не более 2-9% их суммарной активности. Слабопатогенный штамм характеризовался относительно равномерным распределением активности СОД во внеклеточной и мицелярной фракциях (около 65%

и 35%, соответственно). Для патогенного штамма установлен более высокий уровень активности внеклеточных форм КАТ, на порядок и выше превышающий уровень активности цитоплазматических форм мицелия, и в 8-12 раз превышающий активность соответствующих форм КАТ непатогенного штамма (рис. 1, В). Штаммы F1 и F2 имели сравнимый уровень активности внеклеточных форм АПО и низкий уровень активности мицелярных форм фермента (рис. 1, С).

Результат действия АФК на микроорганизмы во многом зависит от редокс-состояния клетки [19]. Не только природа, но и концентрация

АФК влияют на ответную реакцию организма, что указывает на специфичность трансдукции сигнала АФК. Не исключено, что окислительный взрыв недостаточной силы стимулирует антиоксидантные системы паразита, повышая его толерантность к последующему окислительному стрессу [20]. При этом перекись водорода, как наиболее стабильная форма АФК, играет особую роль в регуляции клеточной активности. Известно, что изменение концентрации H_2O_2 в клетках растений запускает каскад ответных реакций. Влияние H_2O_2 на метаболизм патогена менее изучено [21].

Изучали влияние экзогенной перекиси водорода на функционирование антиоксидантных ферментов штаммов гриба *F. solani* с контрастной патогенностью. Ответные реакции культуры гриба анализировали на стационарной стадии роста. Исследованы стресс-индуцирующие концентрации H_2O_2 в диапазоне 0,5-2,0 мМ.

Выявлена противоположная направленность модулирования пероксидом водорода функциональной активности ферментов патогенного и непатогенного штаммов гриба. У патогенного штамма F1 установлена быстрая обратимая индукция активности внеклеточных форм СОД. Индуцирующий эффект перекиси наблюдали уже через 10 минут (8-12%; 2,0 мМ H_2O_2) с максимальной индукцией малыми дозами перекиси (0,5 мМ) через 1 час (27-35%) и подавлением активности мицелярных форм в 2-8 раз через 6 часов после внесения H_2O_2 . В непатогенном штамме, напротив, через 10 минут регистрировали подавление исходной активности внеклеточных форм СОД (на 14-20%) и дальнейший рост с максимумом через 6 часов, на 60-80% превышающий исходный уровень. Такую же динамику (быстрое подавление активности с дальнейшей индукцией через 6 часов) наблюдали и для мицелярных форм фермента (рис. 2).

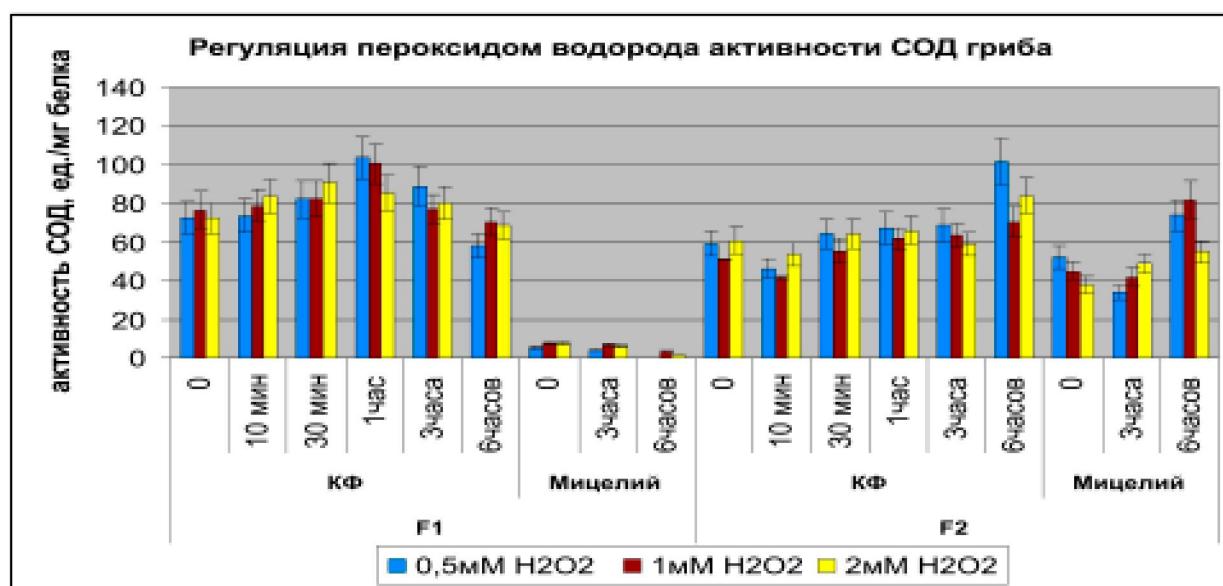


Рис. 2. Влияние экзогенной H_2O_2 на активность супероксиддисмутазы.
Здесь и на рисунках 3 и 4 – внеклеточных (КФ) и цитоплазматических мицелярных (Мицелий) форм ферментов патогенного (F1) и непатогенного (F2) штаммов гриба *F. solani*

Наибольшая реактивность отмечена у минимальной дозы пероксида. Для патогенного штамма выявлен низкий уровень активности мицелярных и экстраплазматических мицелярных форм АПО и отсутствие достоверного влияния на их активность H_2O_2 в анализируемом диапазоне концентраций. Более высокая активность АПО была установ-

лена в экстраплазматической фракции непатогенного штамма гриба, которая ингибировалась перекисью водорода уже через 10 минут, снижаясь в течение 3 часов в 1,7-2,1 раза (рис. 3).

Для каталазы, напротив, установлена активность мицелярных и экстраплазматических мицелярных форм патогенного штамма. Максимальная доза пероксида

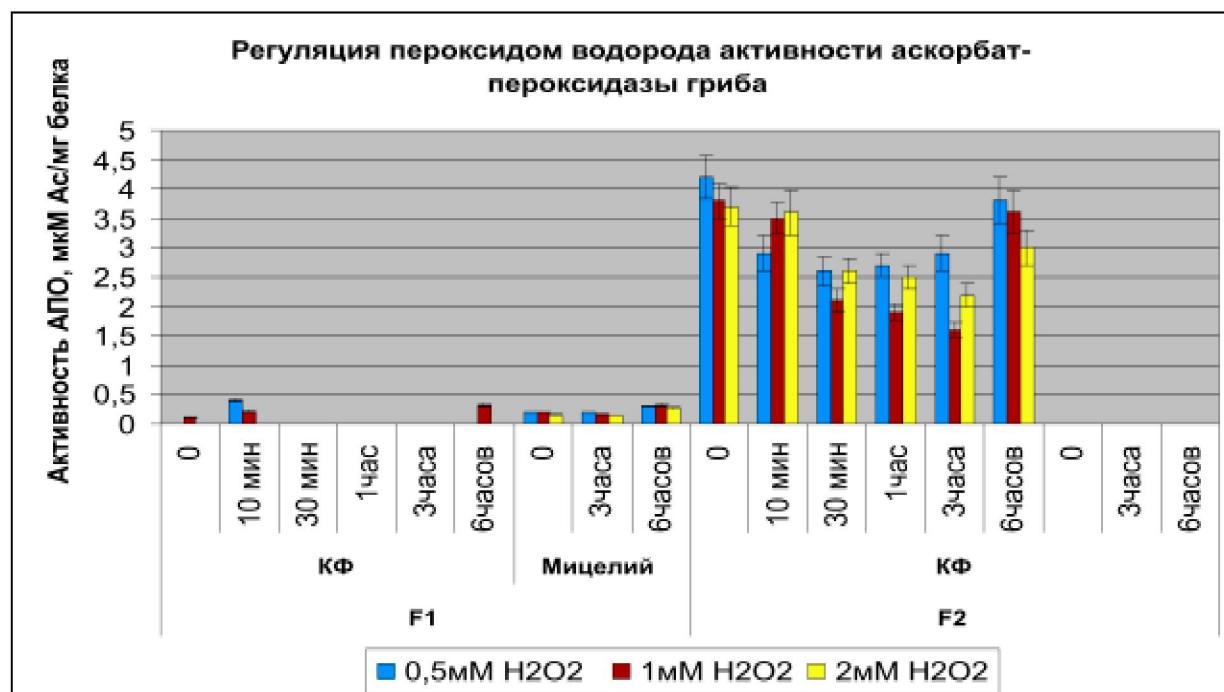


Рис. 3. Влияние экзогенной H_2O_2 на активность аскорбатпероксидазы

(2,0 мМ H_2O_2) обратимо подавляла активность внеклеточной формы КАТ через 10 минут в 2,3 раза, минимальная доза (0,5 мМ H_2O_2) незначительно индуцировала активность внеклеточных (на 12-17%, через 30 минут) и в 2,1-2,5 раза - мицелиарных форм (через 6 часов). Катализная активность непатогенного штамма гриба не установлена (рис. 4).

У фитопатогенных грибов существуют специфические способы продуцирования и контроля уровня АФК, во многом определяющие их взаимоотношения с растением-хозяином. Наличие различных источников АФК и систем их детоксикации позволяет грибам поддерживать концентрацию этих соединений, необходимую для выполнения ими повреждающих, сигнальных или

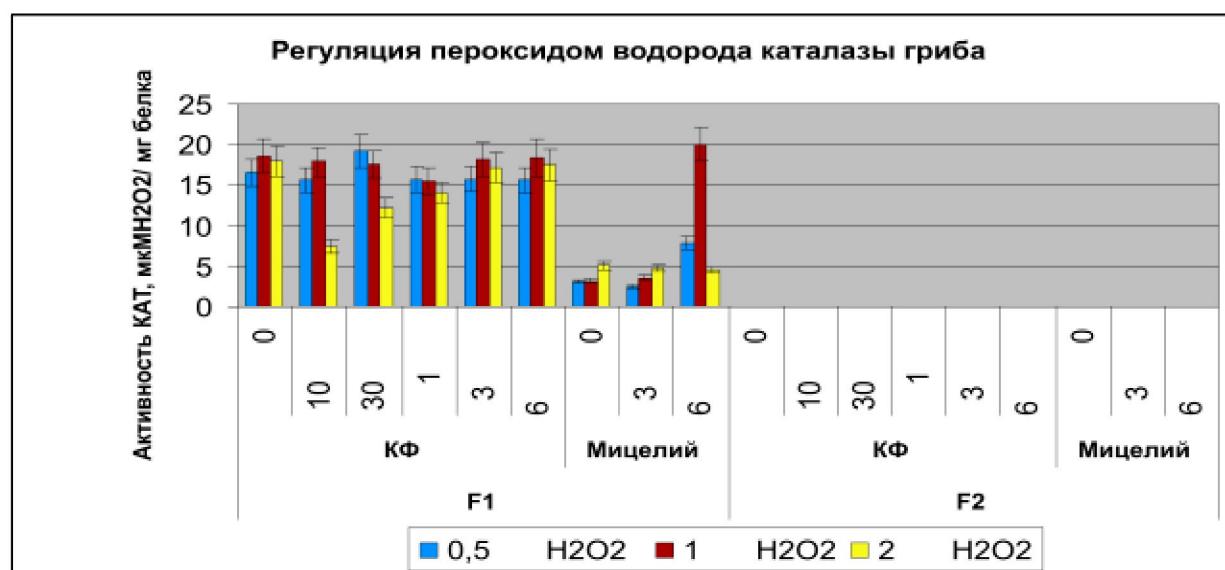


Рис. 4. Влияние экзогенной H_2O_2 на активность каталазы

иных функций. Выявленная противоположная направленность модулирования перекисью водорода функциональной активности антиоксидантных ферментов у патогенного и непатогенного штаммов *F. solani* позволяет сделать предварительный вывод об участии АФК и антиоксидантных систем гриба *F. solani* в формировании его патогенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Droege W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. 2002. 82. P. 47-95.
2. Doke N., Miura Y., Sanchez L.M., Park H.-J., Noritake T., Yoshioka H. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergence signal for plant bio-defence – a review // Gene. 1996. 179. P. 45-51.
3. Ланикова В.П., Гайворовская Л.М., Аверьянов А.А. Возможное участие активных форм кислорода в двойной индукции противоинфекционных реакций растений // Физiol. растений. 2000. 47. N 1. С. 160-162.
4. Pastori G.M., Foyer C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls // Plant Physiol. 2002. 129. P. 460-468.
5. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants. Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review // Ann. Bot. 2003. V. 91. P. 179-194.
6. Hung Sh., Yu Sh., Lin Sh. Hydrogen peroxide functions as stress signal in plants // Bot. Bull. Acad. Sin. 2005. 46: 1-10.
7. Orozco-Cardenas M.F., Narvaez-Vasquez J., Ryan C.A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, sistemin, and methyl jasmonate // Plant Cell. 2001. V. 13, N 2. P. 179-191.
8. Toledano M.B., Delaunay A., Monceau L., Tacnet F. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. Trends Biochem Sci 29:351-357 // Trends Biochem. Sci. 2004. 29. P. 351-357.
9. Paget M.S.B., Buttner M.J. Thiol-based regulatory switches // Annu. Rev. Genet. 2003. 37. P. 91-121.
10. Малиога А.А. Видовой состав и патогенность грибов рода *Fusarium*, вызывающих сухую гниль клубней картофеля в Западной Сибири // Микология и фитопатология. 2003. 37. 4. С. 84-91.
11. Караджесова Л. Фузариозы полевых культур. Кипинев: Штутинца, 1989. 267 с.
12. Билай В.И. Фузарии. Киев: Наукова думка, 1977. 441 с.
13. Aebi H. Catalase in vitro // Methods Enzymology. 1984. 105. P. 121-126.
14. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. 1981. 22. P. 867-880.
15. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276-287.
16. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1971. 352 с.
17. Зайцев Г.Н. Математика в экспериментальной ботанике. М., 1990. 293 с.
18. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 1997. 48. P. 251-275.
19. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. Т. 72, вып. 2. С. 158-174.
20. Govrin E.M., Levine A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* // Curr. Biol. 2000.10. P. 751-757.
21. Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов // Биохимия. 2007. Т. 72, вып. 10. С. 1342-1364.

Резюме

Антиоксидантты ферменттердің: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), аскорбатпероксидаза (АПО) *Fusarium solani* санырауқұлағының патогенді және патоген емес штамдарымен коректік ортада өсірілген кезеңіндегі функционалды белсенділігіне талдау жүргізілді. Саныруқұлактың патогенділігіне байланысты ферменттердің алғашқы белсенділігінен орналасу аумағы көрсетілді. Экзогенді H₂O₂-ның экстрацеллюларлық және мицелиимен байланысты формадағы антиоксидантты жүйелердегі ферменттердің белсенділігіне өсірі қарастырылды. Патогенді штамдарға СОД-ның экстрацеллюларлық формасының артуының тез қайтымылығы тән болса, цитоплазматикалық формадағы КАТ-да бәсендөу индукциясы тән екені анықталды. Ал патоген емес штамдарда H₂O₂ СОД пен АПО-да экстрацеллюларлық және мицелярлық формаларында шашпаң супрессиялану жүргетіні байқалды.

Summary

The analysis of condition of functional activity antioxidant enzymes is carried out: superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APO) at pathogenic and not pathogenic strains of *Fusarium solani* in a cultivation cycle on a nutrient medium. The specificity of localization and level of constitutive activities of enzymes which connected with pathogenicity of strains was shown. The influence of exogenous hydrogen peroxide on activity of extracellular and mycelium forms of antioxidant enzymes was studied. The fast reversible induction of extracellular forms and the prolonged induction of cytoplasmic forms CAT in pathogenic strain was established. Hydrogen peroxide caused fast suppression extracellular and mycelium forms SOD and APO at not pathogenic strain.