



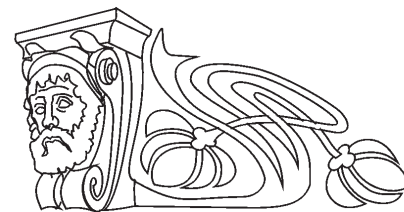
- дов *Dioscorea deltoidea* Wall // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 1998. № 8. С. 178–181.
5. Максимовских С. Ю. Защита картофеля от болезней препаратами группы «стероидные гликозиды» в условиях Курганской области : автореф. дис. ... канд. с/х наук. Краснодар, 2012. 24 с.
 6. Grigorovich M. A., Kudrin B. I., Evdocimov A. N. Investigation of chronic toxicity of furostanolic steroidal glycosides from semen *Capsicum annum* L. // Bitheno-
logii avansate-realizari si perspective. III Simpozion national cu participare international. Chisinau, 2013. P. 47.
 7. Меньщиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник. М. : Медицина, 1987. 368 с.
 8. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л. : Медицина, 1973. 144 с.
 9. Лакин Г. Ф. Биометрия. М. : Высш. шк., 1973. 343 с.

УДК 579.835+581.19

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ АЗОСПИРИЛЛ НА СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ ПЕРОКСИДАЗЫ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Л. В. Косицына, С. А. Коннова, А. А. Галицкая,
Ю. П. Федоненко¹, Е. П. Шувалова

Саратовский государственный университет
¹Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, Саратова
E-mail: Konnovasa@yandex.ru



Приведены данные по определению содержания гваяколизависимой и *o*-фенилензависимой пероксидазы в корнях 2-суточных проростков пшеницы, выращенных в присутствии препаратов ЛПС ассоциативных diaзотрофных ризобактерий *A. brasilense* Sp107 и S17. Показано увеличение активности гваяколовой пероксидазы, вызванное полисахаридами обоих штаммов. Выявлены штаммовые различия в действии ЛПС на содержание кислых и нейтральных фракций *o*-фенилензависимой пероксидазы.

Ключевые слова: пшеница, пероксидаза, *Azospirillum*, липополисахарид.

Effect of *Azospirillum* Lipopolysaccharides on the Content of Various Peroxidase Isoforms in Wheat Seedling Roots

L. V. Kositsyna, S. A. Konnova, A. A. Galitskaya,
Yu. P. Fedonenko, Ye. P. Shuvalova

Data are presented on the content of guaiacol- and *o*-phenylene peroxidases in the roots of 2-day-old wheat seedlings grown in the presence of the lipopolysaccharides of the associative diazotrophic rhizobacteria *A. brasilense* Sp107 and S17. It was shown that the activity of guaiacol peroxidase increased under the effect of polysaccharides from both strains. Strain differences in LPS action on the content of acidic and neutral fractions of *o*-phenylene peroxidase were detected.

Key words: wheat, peroxidase, *Azospirillum*, lipopolysaccharide.

Особую роль в реализации ответных реакций растений на биотический стресс играет суперсемейство пероксидаз (КФ 1.11.1.7). Благодаря широкому спектру изоферментов, пероксидаза

активно реагирует на стрессовые воздействия. К числу биогенных элиситоров, вызывающих индукцию синтеза этих защитных ферментов, относят олигосахариды, белки, гликопротеины и липиды. Некоторые элиситоры обнаружены в среде роста микроорганизмов, другие – в составе клеточных стенок и в содержимом цитоплазмы [1]. Подобную реакцию у растений могут вызывать полисахариды и липополисахариды (ЛПС) внешней мембраны грамотрицательных бактерий [2, 3]. Известно изменение ее активности в растительной ткани в ответ на действие различных стрессовых факторов, в том числе метаболитов потенциально опасных для растения фитопатогенных микроорганизмов. Практически не исследован вопрос о том, какие ответные реакции растений вызывает обогащение почвы бактериальными полисахаридами непатогенных бактерий.

Бактерии рода *Azospirillum*, распространенные в почвах прикорневой зоны широкого круга растений, являются diaзотрофами, стимулирующими рост и развитие растений, благодаря потенциально высокой азотфиксирующей активности. Данные бактерии способны продуцировать фитогормоны и иные физиологически активные вещества. Большой научный и практический интерес представляют ассоциации бактерий *A. brasilense* со злаками, в частности с пшени-



цей, в процессе формирования которых важная роль отводится поверхностным гликополимерам бактерий, в том числе и ЛПС [4].

Целью нашей работы было выявление влияния препаратов ЛПС *Azospirillum brasilense* Sp107 и S17 на изменение содержания феноловых пероксидаз в корнях проростков пшеницы сорта Саратовская 29.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили препараты ЛПС двух штаммов бактерий *A. brasilense* Sp107 и S17. ЛПС получали стандартной процедурой экстракции горячим водным фенолом [5]. После диализа экстракты концентрировали на ротаторном испарителе и титровали 40%-ной ТХУ до pH 2.7, что приводило к выпадению в осадок примеси нуклеиновых кислот и белка. Экстракты вновь диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали.

В качестве растительных объектов использовали пшеницу сорта Саратовская 29 (2009 г. генерации), любезно предоставленную ГНУ НИ-ИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии. Перед стерилизацией зерна промывали детергентом, затем помещали на 1 мин в 70%-ный водный раствор этилового спирта, после чего промывали стерильной дистиллированной водой. Затем семена погружали на 5 мин в диацид и вновь промывали стерильной дистиллированной водой. Контроль стерильности зерен осуществляли, выдерживая их в чашках Петри на мясопептонном агаре 24 ч при 25°C [6].

Растворы препаратов ЛПС готовили в концентрации 0.125 мг/мл в стерильной дистиллированной воде. Стерильные семена выкладывали между двумя слоями фильтровальной бумаги, пропитанными этими растворами и выращивали в течение 2 сут при 25°C [7]. Контролем служили проростки пшеницы, выращенные на стерильной дистиллированной воде.

Для определения содержания пероксидаз использовали модифицированную методику. Грубый белковый экстракт для определения содержания феноловых пероксидаз получали путем гомогенизации корней проростков в 0.01M Na-фосфатном буфере, pH 6.0 (ФБ). Отношение массы навески к объему ФБ было 1:3. Экстракт центрифугировали 25 мин при 12000 g на центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия). Содержание пероксидазы в реакционной смеси из 0.5 мл 0.05%-ного раствора гваякола (2,6-дибромфенола), 200 мкл 0.25%-ной H₂O₂ и 2 мл супернатанта оценивали, измеряя с помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-4 оптическую

плотность при $\lambda = 470$ нм. Контроль готовили аналогичным образом, но без добавления перекиси водорода [8].

В качестве субстратов для исследования содержания феноловых пероксидаз использовали гваякол и *o*-фенилендиамин (ОФДА). Содержание феноловых пероксидаз определяли по калибровочной кривой, построенной по пероксидазе хрена [3].

Для выделения анионной пероксидазы к грубому белковому экстракту дробно добавляли по 200 мг хитина. Отношение массы навески к объему Na-фосфатного буфера было 1:3. После 10 мин инкубации получали нейтральные фракции пероксидаз из надосадочной жидкости. Анионную пероксидазу элюировали с хитина 1M NaCl и количественно определяли микрометодом [9]. В плоскодонные планшеты заливали 0.075 мл экстракта из корней проростков, 0.025 мл раствора ОФДА в концентрации 0.5 мг/мл и добавляли 0.025 мл H₂O₂ (конечная концентрация 0.0015%). Реакцию останавливали добавлением 0.05 мл 4н H₂SO₄. Планшет сканировали на иммуноферментном анализаторе Multiscan Ascent при $\lambda = 492$ нм. Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Ascent Software для Multiscan Ascent («Thermo Electron», Китай). Содержание белка в препаратах определяли микрометодом по модифицированной методике Бредфорд [10].

Электрофорез образцов проводили на приборе для вертикального геля-электрофореза в пластинах полиакриламидного геля, используя систему буферных растворов Лэммли [11].

Результаты и их обсуждение

Для реализации цели исследования определяли содержание гваяколзависимой и *o*-фенилензависимой пероксидаз в корнях 2-суточных проростков пшеницы, выращенных в присутствии препаратов ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp107 и S17.

Штамм *A. brasilense* Sp107 был выделен из корней пшеницы (*Triticum aestivum* L.), а *A. brasilense* S17 – из ризосферы проса жемчужного (*Pennisetum glaucum*). Для анализируемых препаратов ЛПС ранее были обнаружены незначительные отличия в биополимерном составе. Так, в ЛПС штамма Sp107 было показано более высокое (\approx в 1.5 раза) содержание углеводов и отсутствие фосфатов, в то время как ЛПС *A. brasilense* S17 характеризовался присутствием 3.3 % фосфора [12, 13]. Необходимо отметить, что при сходном составе жирных кислот липидов А повторяющиеся звенья



О-специфических полисахаридов (ОПС) ЛПС исследуемых штаммов отличаются кардинально. ОПС штамма *A. brasilense* Sp107 является линейным полимером D-рамнозы [13], представителем широко распространённой серогруппы азоспирилл, среди которых выявлены эндофитные для пшеницы культуры. В то же время в составе ОПС *A. brasilense* S17 установлено наличие двух типов повторяющихся звеньев: тетрасахаридного глюкорамнана, состоящего из трех остатков L-рамнозы в основной и остатка

D-глюкозы в боковой цепи, и разветвленного трисахаридного из остатков 2-O-метил-L-рамнозы, 2-дезоксид-2[(S)-3-гидроксибутаноиламино]маннозы и терминального остатка 2-дезоксид-2-ацетидамоглюкозы [14].

Выращивание растений в присутствии ЛПС азоспирилл привело к увеличению содержания гваяколовой пероксидазы в экстракте проростков пшеницы в 1.6 раза по сравнению с контролем. При этом достоверных различий в активности между препаратами ЛПС не выявлено (рис. 1).

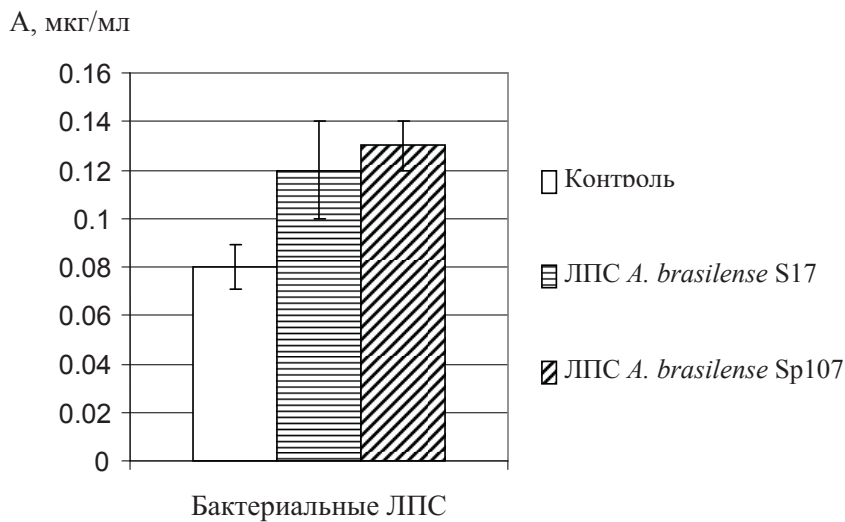


Рис. 1. Влияние ЛПС бактерий *A. brasilense* на содержание гваяколзависимой пероксидазы (КФ 1.11.1.7) в экстрактах проростков пшеницы Саратовская 29 (А – содержание пероксидазы, мкг/мл)

Гваяколовая пероксидаза, окисляющая фенольные соединения, участвует в биосинтезе лигнина, поэтому повышение ее активности может быть как результатом включения антиоксидантной защиты, так и проявлением неспецифических реакций на стресс, связанных с укреплением клеточных стенок [15].

Содержание пероксидазы возрастает при многих изменениях метаболизма, а многие ее изоформы синтезируются при стрессовых влияниях *de novo* [16]. Поэтому мы оценили содержание кислых и нейтральных фракций *o*-фенилензависимой пероксидазы, разделив их с помощью хроматографических методов. Результаты электрофоретического анализа в полиакриламидном геле выделенных фракций *o*-фенилензависимой пероксидазы, представленные на рис. 2, показывают различия в их полипептидных профилях в контрольных образцах. Проращивание семян пшеницы в присутствии бактериальных полисахаридов привело к количественным и качественным изменениям электро-

форетических характеристик полипептидов в экстрактах корней.

Количественное содержание *o*-фенилензависимой пероксидазы во фракциях определяли микрометодом в планшетах для иммуноферментного анализа (рис. 3 и 4). Из данных, представленных на гистограммах, следует, что под воздействием ЛПС *A. brasilense* S17 содержание нейтральной и кислой фракций пероксидаз достоверно не изменилось по сравнению с контролем. В то время как препарат ЛПС *A. brasilense* Sp107 вызывал увеличение содержания изопероксидазы нейтральной – в 2 раза и кислой – в 2.6 раза. Эти данные коррелируют с результатами электрофореза (см. рис. 2).

Анионные пероксидазы характеризуются свойством связываться с хитином клеточных стенок фитопатогенных грибов, что, вероятно, объясняется наличием у этого фермента полисахарид-связывающего домена [17]. Полученный результат соответствует литературным данным о том, что активация основных пероксидаз

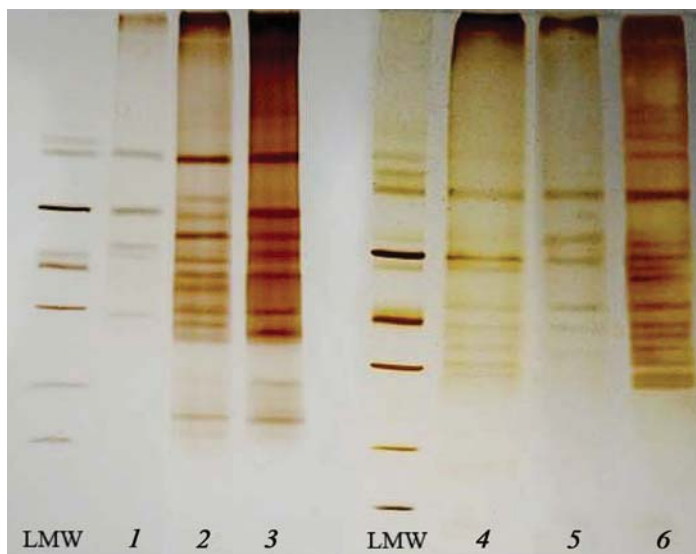


Рис. 2. Электрофорез белков в ПААГ нейтральных (1–3) и кислых (4–6) фракций *o*-фенилензависимой пероксидазы: 1, 4 – контроль (H_2O дист.); 2, 5 – ЛПС *A. brasilense* S17; 3, 6 – ЛПС *A. brasilense* Sp107; LMW – маркеры молекулярных масс

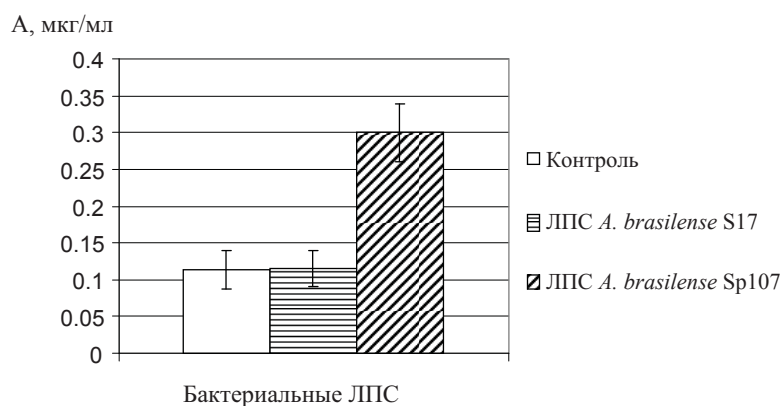


Рис. 3. Влияние ЛПС бактерий *A. brasilense* на содержание *o*-фенилензависимой пероксидазы (нейтральные фракции) (КФ 1.11.1.7) в корнях проростков пшеницы Саратовская 29 (А – содержание пероксидазы, мкг/мл)

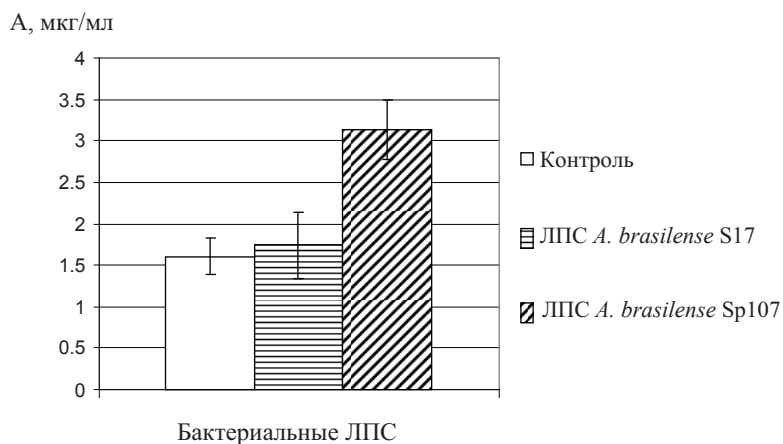


Рис. 4. Влияние ЛПС бактерий *A. brasilense* на содержание *o*-фенилензависимой пероксидазы (кислые фракции) (КФ 1.11.1.7) в корнях проростков пшеницы Саратовская 29 (А – содержание пероксидазы, мкг/мл)



приводит к увеличению активности кислых фракций [16]. Поэтому можно предположить, что активация этих изоформ происходит под действием поверхностных полисахаридов бактерий штамма-изолята из растений пшеницы (Sp107), как более селективного и, возможно, воспринимающегося растением как потенциальный эндофит.

При этом следует отметить, что обработка семян бактериальными полисахаридами в большинстве случаев приводит к увеличению содержания белка в корнях проростков (таблица). Произошло существенное увеличение содержания белка в кислых и нейтральных фракциях экстрактов под влиянием ЛПС *A. brasilense* Sp107 в 8 и 8.7 раз соответственно, а под воздействием ЛПС *A. brasilense* S17 — в 15 и 13.6 раз соответственно. Можно предположить, что эти препараты вызывали проявление защитных реакций в растительных клетках, следствием которых оказался синтез различных пептидных и белковых соединений, в том числе и фермента пероксидазы. Более низкую активность ЛПС *A. brasilense* Sp107 в отношении индукции синтеза белка проростками пшеницы можно объяснить тем, что этот полисахарид оказывает влияние не только на содержание, но и на активность пероксидазы, вызывая синтез наиболее активных ее изоформ.

Содержание белка в корнях проростков пшеницы Саратовская 29, выращенных в присутствии липополисахаридов азоспирилл

Вариант опыта	Содержание белка, мкг/мл	
	кислые фракции	нейтральные фракции
Контроль, без ЛПС	0.8±0.1	1.2±0.1
ЛПС <i>A. brasilense</i> S17	11.3±1.1	16.5±1.0
ЛПС <i>A. brasilense</i> Sp107	5.9±1.3	10.6±1.1

Примечание. Приведены результаты измерений 6 экспериментов; доверительный интервал приведен для надежности 95%.

Полученные результаты показали, что ответные реакции растений с участием пероксидаз могут формироваться на поверхностные полисахариды не только патогенных микроорганизмов, но и на потенциально полезных, отнесённых к группе бактерий, стимулирующих рост растений. Кроме того, учитывая, что одним из перспективных направлений современной фитоиммунологии является поиск индукторов формирования у растений устойчивости к бо-

лезням и стрессам, возможно использование бактериальных полисахаридов непатогенных микроорганизмов р. *Azospirillum* для этих целей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части (код проекта: 1287), а также при частичной поддержке РФФИ (проект № 14-04-01658 А).

Список литературы

1. Перковская Г. Ю., Кравчук Ж. Н., Гроздинский Д. М., Дмитриев А. П. Индукция активных форм кислорода и фитоалексинов в культуре клеток лука (*Allium cepa*) биогенными элиситорами из гриба *Botrytis cinerea* // Физиология растений. 2004. Т. 51, № 5. С. 680–685.
2. Dow M., Newman M. A., von Roepenack E. The induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides // Ann. Rev. Phytopathol. 2000. Vol. 38. P. 241–261.
3. Стадник Г. И., Калашишникова Е. Е., Коннова С. А., Игнатов В. В. Роль поверхностных и внеклеточных соединений бактерии *Xantomonas campestris* в патогенных взаимоотношениях с растениями капусты // Микробиология. 2001. Т. 70, № 2. С. 270–274.
4. Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum* – wheat root interaction // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol. 118, № 2. P. 93–99.
5. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды // Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967. С. 325–332.
6. Рубин Б. А., Зеленова И. В. Влияние разных штаммов ВТМ на содержание пигментов и активности железосодержащих ферментов в листьях *Nicotiana tabacum* L. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология, почвоведение. 1964. № 6. С. 46–50.
7. Викторов С. И. Практикум по физиологии растений / под ред. проф. И. И. Гунара. М.: Колос, 1972. 168 с.
8. Бурханова Г. Ф., Ярулина Л. Г., Максимов И. В. Регуляция хитоолигосахаридами защитных реакций растений пшеницы при инфицировании *Vipolaris sorokiniana* // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 1. С. 119–126.
9. Юсупова З. Р., Ахметова И. Э., Хайруллин Р. М., Максимов И. В. Влияние хитоолигосахаридов на образование перекиси водорода и активность анионных пероксидаз в coleoptilyах пшеницы // Физиология растений. 2005. Т. 52, № 2. С. 238–242.
10. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. 315 с.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
12. Игнатов В. В., Коннова О. Н., Бойко А. С., Фомина А. А., Федоненко Ю. П., Коннова С. А. Характеристика состава жирных кислот липидов А липополи-



- сахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2009. Т. 9, вып. 1. С. 36–41.
13. Бойко А. С., Смолькина О. Н., Федоненко Ю. П., Здоровенко Э. Л., Качала В. В., Коннова С. А., Игнатов В. В. Особенности структуры О-полисахаридов азоспирилл серогруппы I // Микробиология. 2010. Т. 79, № 2. С. 219–227.
14. Fedonenko Yu. P., Konnova O. N., Zdrovenko E. L., Konnova S. A., Zatonksy G. V., Shashkov A. S., Ignatov V. V., Knirel Y. A. Structural analysis of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* S17 // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343. P. 810–816.
15. Алиева Д. Р., Бабаев Г. Г., Азизов И. В. Активность и изоферментный состав пероксидазы // Вісн. Дніпропетров. Ун-ту. Біологія. Медицина. 2010. Вип. 1, т. 1. С. 16–21.
16. Андреева В. А. Фермент пероксидаза : Участие в защитном механизме растений. М. : Наука, 1988. 128 с.
17. Хайруллин Р. М., Юсупова З. Р., Максимов И. В. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. 1. Взаимодействие анионных пероксидаз пшеницы с хитином и телиоспорами *Tilletia caries* // Физиология растений. 2000. Т. 47, № 1. С. 108–113.

УДК 616.9:616-07

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЧУМЫ И ТУЛЯРЕМИИ

О. А. Волох¹, Е. М. Кузнецова¹, А. А. Щербаков²

¹Российский научно-исследовательский институт «Микроб», Саратов

²Саратовский государственный аграрный университет



В работе представлены результаты анализа эффективности экспериментальных антителных диагностических препаратов для детекции чумного и туляремийного микробов методами иммунодиагностики. Экспериментальные диагностикумы получены на основе ряда антигенов внешней мембраны туляремийного (протективный антигенный комплекс) и чумного (солюбилизованные белки внешней мембраны и S-белок) микробов. Показано, что сконструированные иммуноглобулиновые чумные диагностикумы позволяют выявлять штаммы *Y.pestis* не зависимо от температуры культивирования и плазмидного профиля. Экспериментальные туляремийные диагностикумы позволяют выявлять бескапсульные штаммы *F.tularensis* и обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования разработанных экспериментальных диагностических препаратов.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, антигены внешней мембраны, иммунодиагностические препараты.

Assessment of Possibility of Use of the Experimental Immunodiagnostic Preparations in Laboratory Diagnostics of Plague and Tularemia

O. A. Voloh, E. M. Kuznetsova, A. A. Shcherbakov

In work results of the analysis of efficiency experimental the antitelnykh of diagnostic preparations for detection of plague and tularemia my microbes by immunodiagnosics methods are presented. Experimental diagnosticum are received on the basis of a number of anti-genes of an external membrane of tularemia my (a protective anti-gene complex) and plague (solyubilizirovanny proteins of an external membrane and S-squirrels) microbes. It is shown that designed immunoglobulinovy plague diagnosticum allow to reveal strains of *Y.pestis* it isn't dependent

on temperature of cultivation and a plazmidny profile. Experimental tularemia my diagnosticum allow to reveal acapsular strains of *F.tularensis* and possess high sensitivity and specificity. The obtained data testify to prospects of use of the developed experimental diagnostic preparations.

Key words: *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, anti-genes of an external membrane, immunodiagnostic preparations.

Разработка новых высокоспецифичных препаратов и эффективных методических подходов для диагностики чумы и туляремии является актуальной научно-практической задачей в связи с высокой эпидемической значимостью этих природно-очаговых инфекций.

У возбудителя чумы нельзя исключать возможность элиминации плазмид и, соответственно, изменения антигенного состава, а также сохранение атипичными штаммами способности вызывать инфекционный процесс, что снижает диагностическую ценность имеющихся препаратов, основанных на детекции видоспецифических, детерминированных плазмидами антигенов чумного микроба. Кроме того, выращенные при 28°C клетки типичных штаммов чумного микроба не выявляются с помощью иммуноглобулиновых препаратов, полученных к капсульному антигену F1, поэтому требуется дополнительное время для культивирования подозрительных на чуму колоний при 37°C. В связи с этим остается актуальной проблема разработки