

УДК 581.17: 577.15

ВЛИЯНИЕ ФУЗАРИЕВОЙ КИСЛОТЫ НА КОМПОНЕНТЫ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ СУСПЕНЗИОННЫХ КЛЕТОК КАРТОФЕЛЯ С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К *FUSARIUM SOLANI*

О.В. Чебоненко, О.А. Сапко, А.Ш. Утарбаева

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», г. Алматы
a.utar@mail.ru

Фузариевая кислота (ФК) – неспецифический токсин, продуцируемый многими видами *Fusarium*, являющихся причиной заболевания большого числа растений. Образование активных форм кислорода (АФК), так называемый «окислительный взрыв», является одной из наиболее характерных ранних реакций растений на заражение. Известно, что многие неспецифические фитотоксины индуцируют генерацию АФК, и во многих случаях развитие симптомов болезни может быть объяснено этим механизмом. Действие ФК на антиоксидантную систему показано для ряда растений. В проведенном ранее исследовании нами было показано, что ФК, наряду с хорошо известным токсическим действием на клетки, в токсичной и нетоксичной дозах индуцировала компоненты про- и антиоксидантных систем суспензионных клеток картофеля и могла выполнять сигнальную (элиситорную) функцию. Целью данной работы было изучить влияние ФК, в токсичной и нетоксичной дозах, на компоненты окислительного стресса и активность антиоксидантных ферментов в суспензионных клетках картофеля *S. tuberosum* с контрастной устойчивостью к грибу *F. solani*.

Для работы использовали суспензионные культуры клеток, полученные из растений сортов Аксор (относительно устойчивого) и Санта (чувствительного). ФК добавляли в суспензию клеток на стадии лаг-фазы, через 3 суток после их пересадки на новую среду. Показатели про- и антиоксидантных систем измеряли в клетках и среде культивирования, используя соответствующие методики спектроскопического анализа. В работе показано, что ФК индуцировала генерацию перекиси водорода, процессы ПОЛ и модулировала активность антиоксидантных ферментов в суспензионных клетках картофеля с контрастной устойчивостью к *F. solani*. Эффект влияния зависел от исходной устойчивости клеток. Уровень генерации про-оксидантов, вызванной добавлением токсина, был выше у клеток чувствительного сорта. В чувствительных клетках ФК преимущественно индуцировала внеклеточные формы супероксиддисмутазы, вызывала быструю обратимую индукцию каталазы и аскорбат-пероксидазы на ранней фазе стрессового ответа. В клетках устойчивого сорта токсин на этой фазе активировал цитоплазматические формы супероксиддисмутазы, ингибировал активность внеклеточных и цитоплазматических форм каталазы и индуцировал аскорбат-пероксидазу на поздней адаптивной фазе ответа. Сделан вывод, что ФК вовлечена в АФК-сигналинг и регуляцию активности антиоксидантных ферментов, в числе других факторов, определяющих характер взаимодействия (совместимое - несовместимое) в системе *S. tuberosum*-*F. solani*.

Ключевые слова: картофель, культура клеток, устойчивость, фузариевая кислота, перекись водорода, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты.

ВВЕДЕНИЕ

Фузариевая кислота (ФК) – неспецифический токсин, продуцируемый многими видами *Fusarium*, являющихся причиной заболевания большого числа растений [1]. ФК вызывает различные симптомы фузариозного заражения и обладает широким спектром токсического действия на растительный организм. Основными молекулярными мишенями ФК, как и других фитотоксинов, являются компоненты клеточных мембран [2]. Вместе с тем, ее роль в патогенезе остается неясной, так как ее способны продуцировать вирулентные и авирулентные виды *Fusarium*, не вызывающие увядания [3]. Данные, имеющиеся в литературе, указывают на сложное взаимодействие метаболитов, участвующих в патогенезе. Фитотоксины играют важную роль в развитии болезней и, как правило, служат для подавления защитных реакций растений. Однако известны примеры, когда токсины, наряду с токсическим действием, проявляют себя как элиситоры, индуцируя в растениях некоторые защитные реакции [4]. Механизмы, ведущие к болезни или устойчивости, остаются недостаточно изученными.

Образование активных форм кислорода (АФК) является одной из наиболее характерных ранних реакций растений на заражение. На многих примерах показано, что АФК вовлечены в различные реакции взаимодействия хозяин-патоген. АФК и продукты их превращения, в избыточном количестве токсичны для живых организмов, в умеренных концентрациях могут служить вторичными месенджерами при активации генов, экспрессирующих защитные белки растений, и выполнять функции сигнальных интермедиатов, индуцируя разнообразные клеточные реакции, в том числе адаптивные [5]. Динамическое равновесие между образованием АФК и их детоксикацией осуществляется системой антиоксидантной защиты, состоящей из низко- и высокомолекулярных компонентов. Интенсивное изучение в последнее время сигнальной роли АФК и их взаимоотношений с антиоксидантами послужило основанием рассматривать антиоксиданты не только в качестве простых сквенжеров АФК, но и полноправных участников сигнальной трансдукции [6]. Важную роль в многокомпонентной системе антиоксидантов играют специализированные ферменты [7].

Известно, что многие неспецифические фитотоксины индуцируют генерацию АФК, и во многих случаях развитие симптомов болезни может быть объяснено этим механизмом. Эффект токсических доз ФК на про- и антиоксидантные системы был изучен в листьях и культивируемых *in vitro* клетках томата *Lycopersicon esculentum* Mill. [8]. С другой стороны, на культуре клеток *Arabidopsis thaliana* было показано, что в низких нетоксичных концентрациях (меньше 10^{-5} М), ФК могла индуцировать типичные защитные ответы растений, такие как накопление АФК, увеличение цитозольного Ca^{2+} , биосинтез фитоалексинов, и выполнять сигнальную функцию во взаимодействиях хозяин - патоген [9]. В проведенном ранее исследовании нами было показано, что ФК, наряду с хорошо известным токсическим действием на клетки, в токсичной и нетоксичной дозах индуцировала компоненты про- и антиоксидантных систем суспензионных клеток картофеля и могла выполнять сигнальную (элиситорную) функцию [10].

Совместимые и несовместимые взаимоотношения в системе хозяин - патоген определяются, в том числе, способностью к индукции защитных ответов растений элиситорами, в роли которых могут выступать и неспецифические токсины. Для подтверждения сигнальной функции ФК, дальнейшей оценки роли АФК и антиоксидантной системы в реализации совместимых и несовместимых взаимоотношений в системе хозяин - патоген, целесообразным было проанализировать эффекты ФК на клетки картофеля с разной устойчивостью исходного генотипа. Цель данной работы – изучить влияние ФК, в токсичной и нетоксичной дозах, на генерацию H_2O_2 , перекисное окисление липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и аскорбатпероксидазы (АсПО) в суспензионных клетках картофеля *S. tuberosum* с контрастной устойчивостью к *F. solani*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали суспензионные культуры клеток, полученные из сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с разной устойчивостью к *F. solani*: Аксор (относительно устойчивый), Санта (чувствительный). Суспензию клеток получали и культивировали как описано ранее [10]. Жизнеспособность клеток оценивали цитологическим методом по прижизненной окраске 0,1% раствором метиленового синего.

ФК добавляли в суспензию клеток на стадии лаг-фазы, через 3 суток после их пересадки на новую среду. Для работы использовали клеточные линии, с приблизительно одинаковой исходной жизнеспособностью и плотностью клеток. Клетки отделяли от культуральной жидкости, пробы фиксировали жидким азотом. Замороженный материал хранили до проведения анализа при $-70^{\circ}C$. Культуральный фильтрат (экстрацеллюлярная фракция) и фракцию клеток (цитоплазматическая фракция) анализировали отдельно.

Содержание H_2O_2 определяли согласно Gay [11]. Для этого 0,2-0,3 г клеток суспензии гомогенизировали в 1,5 мл 0,05 М боратного буфера, pH 8,4 и центрифугировали 5 минут при 12000 g. Реакционная смесь содержала 0,2 мл супернатанта анализируемого образца, 1 мл 125 μ М раствора ксиленолового оранжевого, содержащего 100 мМ сорбитола и 10 мкл раствора, содержащего 25 мМ $FeSO_4$, 25 мМ $(NH_4)_2SO_4$ и 2,5 М H_2SO_4 . Смесь перемешивали и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Поглощение раствора измеряли при 560 нм против H_2O .

Интенсивность ПОЛ анализировали по накоплению в клетках малонового диальдегида (МДА). Для определения содержания МДА 300 мг клеток суспензии гомогенизировали в 5 мл раствора выделения (0,1 М Трис-НСl-буфер, pH 7,6, содержащего 0,35М NaCl). К 3 мл гомогената добавляли 2 мл 0,5% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты в 20% ТХУ. Пробирки кипятили в течение 30 минут в водяной бане, фильтровали и измеряли поглощение при $\lambda=532$ нм. Контролем служила среда выделения с реагентом. Расчет концентрации МДА проводили по молярной экстинкции [12].

Для анализа ферментативной активности цитоплазматической фракции клетки суспензии (0,3-0,4 г) гомогенизировали в 3,0 мл 0,05 М Трис-НСI-буфера, рН 7,8, содержащего 1 мМ Na₂-ЭДТА, 3% (вес/объем) растворимого поливинилпирролидона, 5 мМ меркаптоэтанол. Ферменты анализировали в супернатанте, отделяя цитозольную фракцию от грубых клеточных фрагментов центрифугированием при 10000 г 20 минут. Все операции проводили при 2-4°С.

Активность КАТ определяли по распаду H₂O₂ при 240 нм в Na-фосфатном буфере (рН 6,5). Реакционная смесь содержала 2 мл 0,1М Na-фосфатного буфера (рН 6,5), 100 мкл H₂O₂ (конечная концентрация 12,5 мМ), 50 мкл анализируемого образца. Коэффициент экстинкции H₂O₂ при 240 нм 0,040 (мМ см)⁻¹. Активность фермента выражали в μМ H₂O₂/(мг белка мин) [13].

Активность АсПО определяли по разложению аскорбиновой кислоты при 290 нм в Трис-НСI-буфере (рН 7,8). Реакционная смесь содержала 2 мл 0,2 М Трис-НСI-буфера (рН 7,8), 100 мкл 5,6 мМ аскорбиновой кислоты, 100 мкл 11,25 мМ H₂O₂, 100 мкл анализируемого образца. Коэффициент экстинкции аскорбиновой кислоты при 290 нм 2,8 (мМ см)⁻¹. Активность фермента выражали в μМ аскорбата/(мг белка мин) [14].

Суммарную активность СОД определяли по методу [15]. Активность фермента определяли, используя 50 мМ К-фосфатный буфер (рН 7,8), содержащий 0,1 мМ Na₂-ЭДТА, 150 μМ нитросинего тетразолия и 26 мМ метионин. Реакцию запускали добавлением к 180 мкл 150 мкМ нитросинего тетразолия и 5 мкл супернатанта 180 мкл 8 μМ рибофлавина с последующей инкубацией на свету (лампа дневного света, 33 ватт, 20 мин). Оптическую плотность измеряли при 560 нм. За единицу активности принимали 50% ингибирования образования формазана. Активность фермента выражали в ед. акт./ (мг белка мин).

Концентрацию белка в ферментных препаратах измеряли по методу Bradford, используя в качестве контроля бычий сывороточный альбумин.

Данные получены в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы EXCEL из пакета Microsoft Office.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность и рН среды культивирования

Токсичность ФК определяли по влиянию на жизнеспособность суспензионных клеток картофеля и анализировали в диапазоне концентраций 10⁻³ – 10⁻⁸ М, как описано ранее [10]. Полученные данные позволили рассматривать концентрации ФК от 10⁻⁴ М и выше как токсичные, ниже 10⁻⁴ М – нетоксичные. Чувствительность к ФК в диапазоне испытанных концентраций у суспензионных клеток *S.tuberosum* с разной устойчивостью исходных сортов к *F.solani* отличалась незначительно. Наибольшее различие регистрировали при использовании максимальной концентрации (10⁻³ М). В этой дозе ФК снижала жизнеспособность клеток через 48 часов у чувствительного сорта на 32±6%, у относительно устойчивого сорта – на 25±6%. На суспензионных клетках томатов было показано, что концентрация 0,56 мМ ФК была в два раза токсичнее для клеток чувствительного сорта, чем устойчивого к *Fusarium oxysporum* [16]. Зависимость токсического действия ФК от устойчивости исходного генотипа культуры клеток описана для мускусной дыни *Cucumis melo*, для концентрации ФК 0,02 мМ. Эффект ФК в концентрации 0,11 мМ на оба генотипа был одинаковым. Сходный эффект наблюдался для клеток *Asparagus officinalis*, где цитотоксический эффект (0,04-0,06 мМ) зависел от исходной устойчивости клеток, а действие летальных доз (0,08-0,2 мМ) вызывало одинаковые эффекты [17].

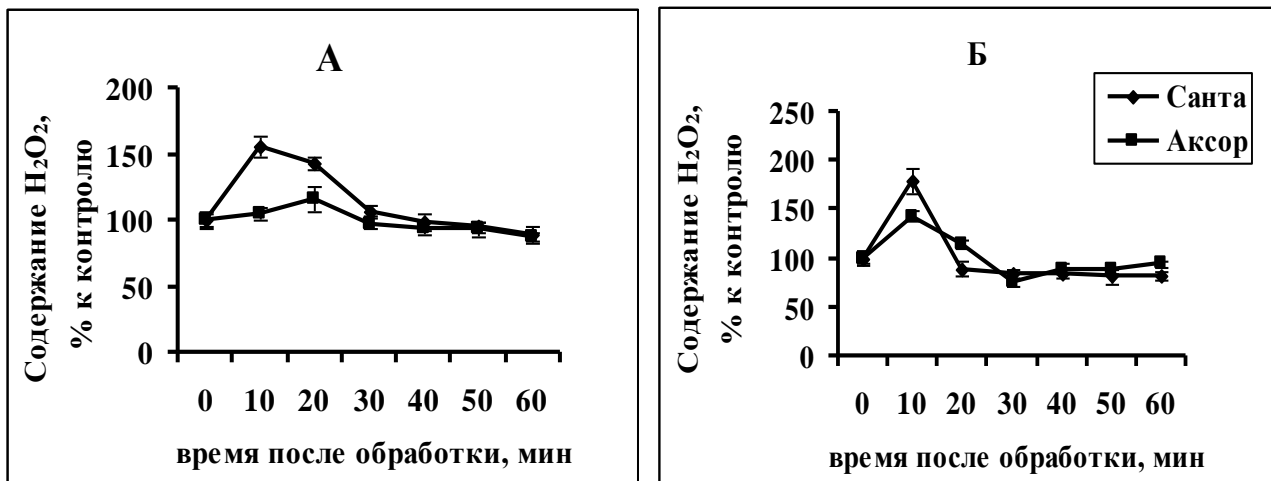
Нарушение барьерно-транспортных свойств плазматической мембраны лежит в основе первичного воздействия фитотоксинов на организм растения-хозяина. Влияние ФК на проницаемость плазматической мембраны анализировали по изменению рН среды культивирования. Нетоксичная доза ФК (10⁻⁶М) рН среды по сравнению с контролем достоверно не изменяла. Токсичная концентрация ФК (10⁻³М) вызывала в суспензионных культурах обеих линий постепенное защелачивание среды культивирования с рН 5,0-5,3 до рН 6,7-7,4 через 48 часов после обработки клеток. Подобный эффект защелачивания наблюдался у многих культур [8, 9]. В суспензионных культурах томата изменения рН среды культивирования, вызванные ФК, зависели от исходной устойчивости клеток: в чувствительных клетках наблюдалось закисление, в устойчивых – защелачивание среды культивирования. На этом основании авторы сделали вывод о более выраженном у чувствительного сорта повреждении проницаемости мембраны и протонировании среды культивирования [16].

Влияние ФК на компоненты про-оксидантной системы

Ключевым компонентом клеточных взаимодействий растения и патогена является генерация АФК, физиологическое действие которых зависит от количества, химической природы,

компартиментации, времени образования и от их взаимодействий с антиоксидантами [18]. Благодаря относительной стабильности и способности проникать через клеточные мембраны, H_2O_2 , наряду с другими АФК, играет особую роль в функционировании сигнал-транскрипционных систем, участвуя как во внутриклеточной, так и в межклеточной сигнализации [19].

ФК, в токсичной и нетоксичной концентрациях, генерировала через 10-20 минут обратимое накопление H_2O_2 , как в чувствительных, так и в устойчивых клетках (рис. 1).



А – влияние 10^{-3} М ФК, Б – 10^{-6} М ФК. Здесь и на следующих рисунках: Аксор – относительно устойчивый, Санта – чувствительный к *F. solani* сорт

Рис. 1. Влияние ФК на содержание H_2O_2 в клетках суспензии *S. tuberosum*

В чувствительных клетках обе дозы ФК на стадии быстрого ответа индуцировали более высокий уровень накопления пероксида, чем в устойчивых. Нетоксичная концентрация ФК вызывала более высокий уровень генерации H_2O_2 : в чувствительных клетках на $79 \pm 8\%$, в устойчивых – на $43 \pm 5\%$; токсичная, соответственно, на $55 \pm 6\%$ и $14 \pm 5\%$. На более поздней стадии стрессовой реакции (через 48 часов), токсичная доза ФК индуцировала накопление H_2O_2 , превышающее исходный уровень в чувствительных клетках в 6-7 раз, в устойчивых – в 3-4 раза, вызывая на этой фазе программируемую гибель клеток. Обратимую генерацию H_2O_2 на стадии быстрого ответа ФК, в токсичной (10^{-4} М) и нетоксичной дозе (10^{-7} М), индуцировала в культуре клеток *A. thaliana* [9]. В культуре клеток томата, напротив, токсичные дозы ФК не изменяли внутриклеточного уровня пероксида, но увеличивали содержание $O_2^{\bullet-}$ во внеклеточной (экстрацеллюлярной) фракции [8].

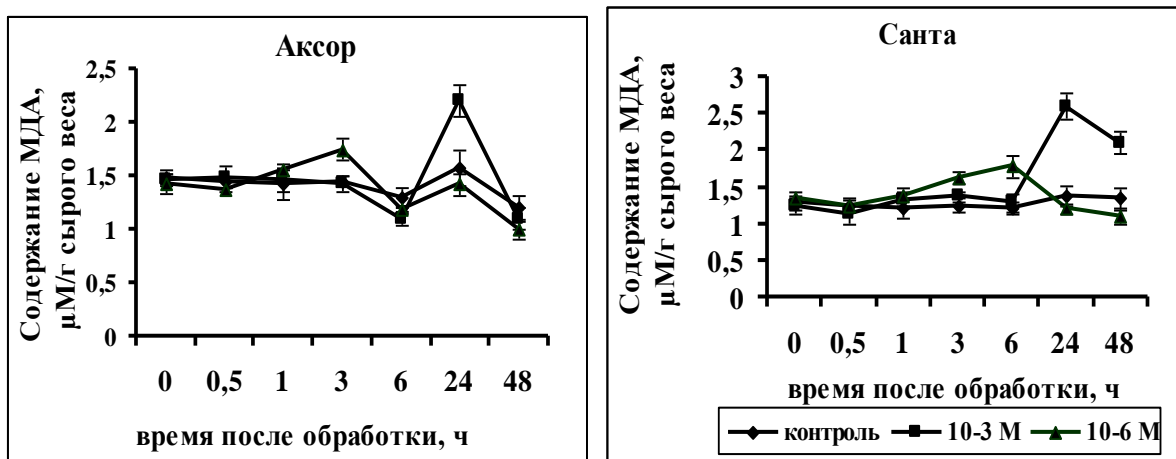


Рис. 2. Влияние ФК на интенсивность ПОЛ в суспензии клеток устойчивого (А) и чувствительного (Б) сорта *S. tuberosum*

Обработка клеток картофеля ФК индуцировала ПОЛ, интенсивность и динамика которого зависели от устойчивости. Низкая концентрация ФК (10^{-6} М), не обладая токсическим эффектом,

вызывала обратимую индукцию ПОЛ на ранней стадии стрессовой реакции, через 3-6 часов, с большей степенью индукции ПОЛ в чувствительных клетках (на 30-35%) по сравнению с устойчивыми (на 21-25%). Влияние токсических доз ФК регистрировали заметно позднее, через 24 часа. В клетках устойчивого сорта наблюдали обратимое усиление ПОЛ, в 1,5-1,6 раз, в чувствительных клетках – в 1,9-2,1 раза (рис. 2). Двукратную обратимую индукцию ПОЛ регистрировали в клетках суспензии томата при обработке токсичной для клеток концентрацией ФК ($2 \times 10^{-4} \text{M}$) [8]. Стресс-индуцированная активация ПОЛ вызывает существенные изменения в структуре и функциях мембран, при значительных воздействиях приводящих к необратимым нарушениям. Образующиеся при умеренных воздействиях, продукты ПОЛ могут выступать в качестве первичных медиаторов стресса, в том числе включая соответствующие защитные механизмы [20].

Влияние ФК на активность антиоксидантных ферментов

Специализированные ферментные антиоксиданты играют важную роль в защите клеток и тканей от окислительных повреждений и являются полноправными участниками сигнальной трансдукции. Их стресс-зависимая активация является ключевым моментом адаптации и выживания растений. Известно, что значительная часть активных систем генерации АФК локализована на внешней поверхности растительной клетки, в плазматической мембране и матриксе клеточной стенки. Поэтому изучали влияние ФК на внеклеточные (экстрацеллюлярные) и цитоплазматические формы ферментов. Одним из ключевых ферментов антиоксидантной защиты является СОД, выполняя функцию утилизации супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Исходная конститутивная активность внеклеточных СОД в 5-8 раз превышала активность цитоплазматических форм. ФК вызывала в клетках обоих сортов быструю обратимую двухфазную индукцию внеклеточных форм СОД, близкую по динамике и уровню индукции для токсичной и нетоксичной доз (рис. 3).

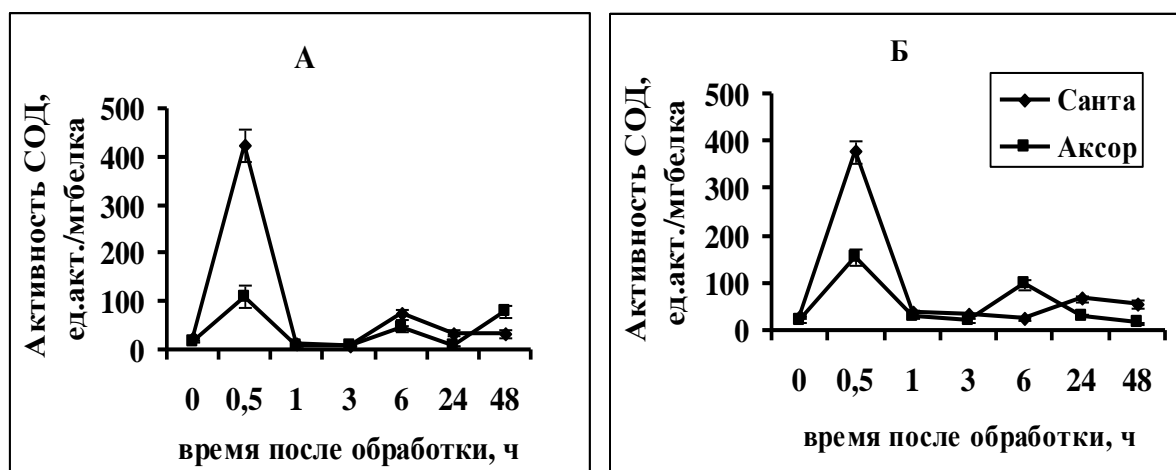


Рис. 3. Влияние токсичной (А) и нетоксичной (Б) концентраций ФК на активность экстрацеллюлярных форм СОД суспензионных клеток *S. tuberosum*

В чувствительных клетках на стадии быстрого неспецифического ответа (через 0,5 часов) уровень индукции СОД, вызванный ФК, был в 3-4 раза выше, чем в клетках устойчивого сорта. При этом, в клетках устойчивого сорта ФК заметно сильнее, чем в чувствительных, индуцировала активность цитоплазматических форм (таблица).

Таблица - Влияние ФК на активность цитоплазматических форм антиоксидантных ферментов суспензионных клеток *S. tuberosum* с разной устойчивостью к *F. solani* (Аксор – устойчивый, Sancta – чувствительный сорт)

Время после обработки, ч	Активность антиоксидантных ферментов					
	СОД, ед.акт./мг белка		КАТ, $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$.		АсПО, μM аскорбата / (мг белка мин).	
	Санта	Аксор	Санта	Аксор	Санта	Аксор
	+ 10^{-3} М ФК					
0	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,4	2,4 ± 0,3	5,3 ± 0,7	0,25 ± 0,03	0,16 ± 0,02
0,5	2,9 ± 0,4	4,0 ± 0,6	4,1 ± 0,6	4,4 ± 0,6	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01
1	1,7 ± 0,2	5,7 ± 0,9	1,4 ± 0,1	4,7 ± 0,7	0,24 ± 0,02	0,11 ± 0,01
3	1,9 ± 0,3	6,5 ± 0,9	3,7 ± 0,5	4,1 ± 0,5	0,29 ± 0,04	0,06 ± 0,01
6	3,5 ± 0,6	6,8 ± 1,1	3,2 ± 0,3	4,6 ± 0,5	1,23 ± 0,17	0,09 ± 0,01
24	4,6 ± 0,7	5,2 ± 0,7	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3	0,35 ± 0,05	0,11 ± 0,02
48	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,4	1,9 ± 0,2	5,2 ± 0,8	0,18 ± 0,02	0,52 ± 0,08
	+ 10^{-6} М ФК					
0	2,6 ± 0,4	4,1 ± 0,6	3,5 ± 0,5	7,4 ± 0,9	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,02
0,5	4,9 ± 0,7	17,0 ± 2,1	4,1 ± 0,5	5,8 ± 0,8	0,22 ± 0,03	0,25 ± 0,03
1	1,8 ± 0,2	11,2 ± 1,6	2,1 ± 0,3	5,2 ± 0,6	0,13 ± 0,01	0,54 ± 0,05
3	2,4 ± 0,3	10,2 ± 1,2	5,0 ± 0,7	6,1 ± 0,8	0,22 ± 0,02	0,11 ± 0,01
6	7,1 ± 1,2	3,4 ± 0,4	4,6 ± 0,6	1,7 ± 0,2	0,23 ± 0,03	0,14 ± 0,02
24	3,2 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3	0,31 ± 0,04	0,11 ± 0,01
48	4,6 ± 0,6	4,9 ± 0,5	2,4 ± 0,3	6,9 ± 0,7	0,62 ± 0,07	0,98 ± 0,1

Важную роль в детоксикации H_2O_2 играет каталаза и различные пероксидазы, в том числе АсПО [7]. Исходная активность КАТ была выше в устойчивых клетках (в 1,8-2,2 раза) и примерно одинаковой для цитоплазматических и внеклеточных форм. Эффект ФК на активность КАТ в клетках с разной устойчивостью заметно различался. В чувствительных клетках нетоксичная и токсичная дозы ФК вызывали быструю двухфазную обратимую индукцию активности КАТ, сходную по динамике, но отличающуюся по уровню индукции у цитоплазматических и внеклеточных форм (рис. 4, таблица).

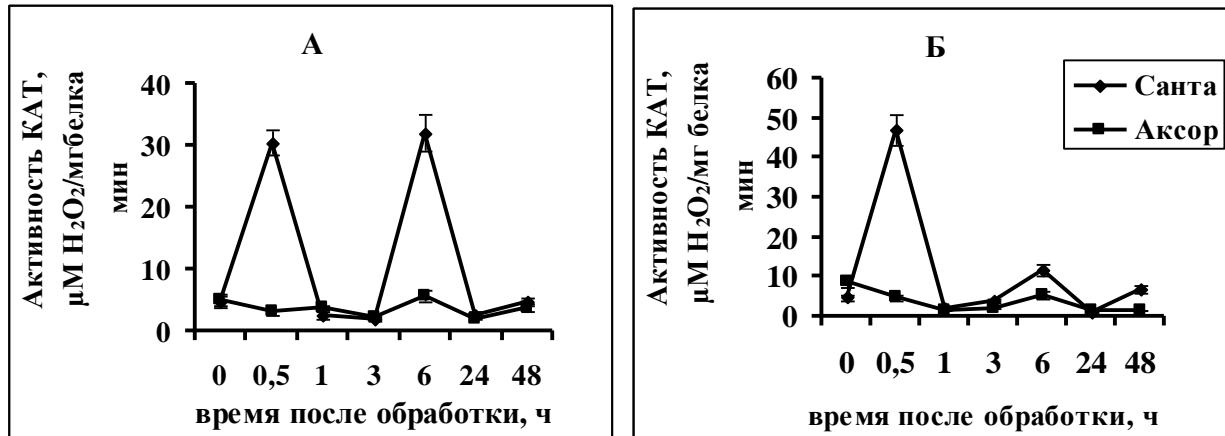


Рис. 4. Влияние токсичной (А) и нетоксичной (Б) концентраций ФК на активность экстрацеллюлярных форм КАТ суспензионных клеток *S. tuberosum*

Максимальную индукцию активности, в 8-9 раз, регистрировали для внеклеточных форм КАТ, при обработке клеток нетоксичной концентрацией ФК. Значительно меньшее влияние оказывала ФК на внутриклеточные формы КАТ, вызывая их индукцию в 1,4-2,6 раз. В устойчивых клетках ФК, в токсичной и низкой дозах, вызывала на фазе быстрого ответа подавление активности КАТ, внеклеточных форм в 2-4 раза, цитоплазматических – в 1,3-1,6 раз.

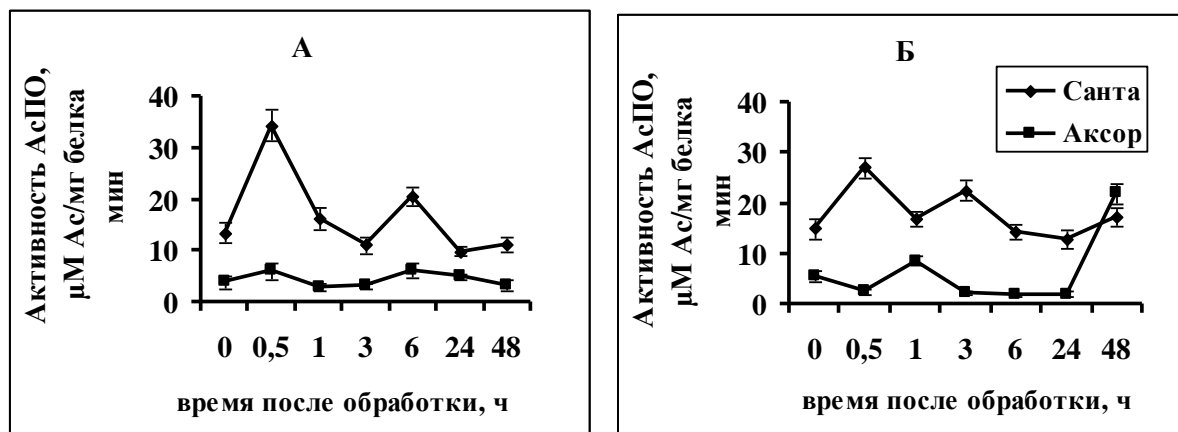


Рис. 5. Влияние токсичной (А) и нетоксичной (Б) концентраций ФК на активность экстрацеллюлярных форм АсПО суспензионных клеток *S. tuberosum*

АсПО утилизирует H_2O_2 с участием аскорбиновой кислоты. Исходная активность внеклеточных форм АсПО была многократно выше цитоплазматических. В клетках чувствительного сорта ФК вызывала быструю обратимую двухфазную индукцию внеклеточных форм АсПО, сходную по динамике, но меньшую по уровню индукцию при обработке клеток нетоксичной дозой (рис. 5). Цитоплазматические формы фермента также обратимо индуцировались на ранней фазе стрессовой реакции: токсичной концентрацией ФК в 5-6 раз через 6 часов и нетоксичной концентрацией – на поздней фазе ответа (в 3-4 раза через 48 часов). В устойчивых клетках токсичная доза ФК не оказывала заметного влияния на внеклеточные формы АсПО, и индуцировала внутриклеточные формы фермента в 3-3,5 раза через 48 часов (таблица).

Действие токсических доз ФК на про- и антиоксидантные системы было детально исследовано в листьях и клетках суспензии *L. esculentum* в работах Kuzniak E. с соавторами. ФК ингибировала активность антиоксидантных ферментов в листьях томата, но обратимо индуцировала СОД, КАТ, АсПО в суспензионных клетках [8], что наблюдалось для суспензионных клеток картофеля чувствительного сорта и в нашем случае.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты показывают, что в суспензионных клетках картофеля ФК, в токсичной ($10^{-3}M$) и нетоксичной ($10^{-6}M$) концентрациях, индуцировала на фазе быстрого неспецифического ответа обратимую генерацию H_2O_2 , ПОЛ и влияла на активность антиоксидантных ферментов с различной локализацией в клетках. Эффекты влияния ФК зависели от устойчивости исходного генотипа клеток к *F. solani*. Уровень генерации H_2O_2 , ПОЛ и индукции активности внеклеточных форм антиоксидантных ферментов, вызванные ФК, были выше у клеток чувствительного сорта. Нетоксичные концентрации ФК, регистрируемые при совместимых взаимодействиях, вызвали сопоставимые с токсичными концентрациями уровни ответов. В чувствительных клетках ФК преимущественно индуцировала внеклеточные формы СОД, вызвала быструю обратимую индукцию КАТ и АсПО на ранней фазе стрессового ответа. В клетках устойчивого сорта ФК преимущественно активировала цитоплазматические формы СОД, ингибировала на ранней фазе ответа активность внеклеточных и цитоплазматических форм КАТ и индуцировала АсПО на поздней фазе ответа.

Таким образом, установлено, что ФК в токсичной и нетоксичной концентрациях способна индуцировать типичный быстрый неспецифический защитный ответ, выраженный в активировании компонентов сигнальной трансдукции, необходимых для его формирования, и осуществлять регуляцию клеточного метаболизма. ФК может выступать в роли химического сигнала грибов рода *Fusarium*, формируя через АФК-сигналинг и антиоксидантные системы различный характер взаимодействия растения - хозяина с патогеном (совместимый - несовместимый).

Работа была выполнена в рамках Государственной Программы фундаментальных исследований Республики Казахстан Ф.0479 по проекту 4.1.1 – 1494ФИ.

Литература

1. Bacon C.W., Porter J.R., Norred W.P., Leslie J.F. Production of Fusaric Acid by *Fusarium* Species // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – Vol. 62. – P. 4039-4043.
2. D'Alton A., Etherton B. Effect of Fusaric Acid on Tomato Root Hair Membrane Potentials and ATP Levels // *Plant Physiol*. – 1984. – Vol. 74. – P. 39-42.
3. Билай В.И. Фузариин. - Киев: Наукова думка, 1977. - 441 с.
4. Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Лебран М.А. Тенуазоновая кислота, токсин возбудителя пирикулярриоза, индуцирует болезнестойчивость и продукцию активных форм кислорода в растениях риса // *Физиология растений*. -2007. - Т. 54, №6. - С. 841–846.
5. Torres M.A, Jones J.D., Dangl J.L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens // *Plant Physiol*. - 2006. - Vol. 141. - P. 373–378.
6. Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // *Antioxid. Redox Signal*. - 2009. - Vol. 11. - P. 861-906.
7. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Обозный А.И. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров // *Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия биология*. - 2011. – Т. 1(22). - С. 6-24.
8. Kuzniak E. Effect of Fusaric Acid on Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Tomato Cell Culture // *J. Phytopathology*. - 2001. - Vol. 149. - P. 575-582.
9. Bouzigarne B., El-Maarouf-Boutenau H., Frankart C., Rebutier R., Madiona K., Pennarun A.M., Monestiez M., Trouverie J., Amiar Z., Brian J., Brault M., Rona J.P., Ouhdouch Y., Hadrami I.E., Bouteau F. A. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cell to fusaric acid: Toxic and signaling effects // *New Phytologist*. - 2006. - Vol. 169. - P. 209-218.
10. Сапко О.А., Утарбаева А.Ш., Макулбек С. Влияние фузариевой кислоты на про- и антиоксидантные свойства суспензионной культуры картофеля // *Физиология растений*. - 2011. - Т. 58, №5. - С. 828-835.
11. Gay C., Collins J. and Gebicki J. M. Hydroperoxide Assay with the Ferric–Xylenol Orange Complex // *Analytical Biochemistry*. - 1999. - Vol. 273. - P. 149-155.
12. Жиров В.К., Мерзляк М.Н., Кузнецов Л.В. Перекисное окисление мембранных липидов холодостойких растений при повреждении отрицательными температурами // *Физиология растений*. - 1982. - Т. 29. - С. 1045-1052.
13. Aebi H. Catalase in vitro // *Methods Enzymology*. - 1984. - Vol. 105. - P. 121-126.
14. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol*. - 1981. - Vol. 22. - P. 867-880.
15. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // *Anal. Biochem*. - 1971. - Vol. 44. - P. 276-287.
16. Gapillout I., Milat M.L, Blein J.P. Effect of fusaric acid on cells from tomato cultivars resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* // *Eur. J. Plant Pathol*. - 1996. - Vol. 102. - P. 127-132.
17. Jullien M. Effect of the *Fusarium* sp. toxins and selection of crude toxin resistant strains in mesophyll cell cultures of *Asparagus officinalis* // *Plant Physiol Biochem*. - 1988. - Vol. 26. - P. 713-721.
18. Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Braz. J. Med. Biol. Res*. - 2005. - Vol. 38. - P. 995-1014.
19. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. - М.: Наука, 2002. – 294 с.
20. Desikan R., Neill S.J., Hancock J.T. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Free radical biology and medicine*. - 2000. - Vol. 28, №5. - P. 773-778.

Түйін

Фузарий қышқылы – көптеген өсімдіктерде ауру туғызатын, *Fusarium* саңырауқұлақтарының көптеген түрлері өндіретін арнайы емес токсин. Оттектің активті формаларының түзілуі, яғни «оттектің жарылуы» өсімдіктердің зақымдануына тән ерте реакциялардың бірі болып табылады. Көптеген арнайы емес фитотоксиндердің оттектің активті формаларының генерациясын индуцирлейтіні белгілі және көп жағдайда аурудың даму симптомдары осы механизммен байланысты деп көрсетілген. Фузарий қышқылының антиоксиданттық жүйеге әсері бірқатар өсімдіктер үшін көрсетілген. Біздің бұдан бұрын жүргізген зерттеулерімізде фузарий қышқылының өсімдік жасушаларға белгілі уытты әсерімен қатар, картоптың суспензиялық жасушаларындағы про- және антиоксиданттық жүйенің компоненттерін уытты және уытсыз мөлшерде индуцирлейтіні және сигналдық (элиситорлық) қызметті орындай алатыны көрсетілген. Бұл жұмыстың мақсаты фузарий қышқылының уытты және уытсыз мөлшерде *Fusarium solani* саңырауқұлағына төзімді контрасты картоптың суспензиялық жасушалардағы антиоксиданттық ферменттердің белсенділігіне және тотығу стресінің компоненттеріне әсерін зерттеу болып табылады.

Жұмыста Аксор (біркелкі төзімді) және Санта (сезімтал) өсімдік сұрыптарынан алынған жасушалардың суспензиялық дақылдары қолданылды. Фузарий қышқылының картоптың жасуша суспензиясына жаңа қоректік ортаға отырғызғаннан кейін 3 тәуліктен соң лаг - фаза кезеңінде қостық. Жасушадағы және дақылдау қоректік ортасындағы про- және антиоксиданттық жүйелердің көрсеткіштерін сәйкес спектроскопиялық талдау әдістерін қолдану арқылы өлшедік. Жұмыста фузарий қышқылының *Fusarium solani* саңырауқұлағына қарама - қарсы төзімді картоптың суспензиялы жасушалардағы антиоксиданттық ферменттердің белсенділігін модульдеуі және сутегі асқын тотығы, липидтердің сутегі асқын тотығу үрдістерінің таралуын жоғарылататыны көрсетілді. Әсер ету тиімділігі жасушалардың алғашқы төзімділігіне байланысты болды. Уытты қосу арқылы пайда болған прооксиданттардың таралу деңгейі сезімтал сұрыптың жасушаларында жоғары болды. Сезімтал жасушаларында фузарий қышқылы көбінесе супероксид дисмутазаның жасушадан тыс пішіндерін индуцирледі, стресс жауабының алғашқы фазаларында каталазаның және аскорбат пероксидазаның тез қайтымды индукциясын шақырды. Осы фазада токсин тұрақты сұрып жасушаларында супероксид дисмутазаның цитоплазмалық пішіндерін белсендендірді, жасушадан тыс цитоплазмалық каталазаның белсенділігін бәсеңдетті және соңғы адаптивті жауап фазасына аскорбат пероксидазаны индуцирледі. Фузарий қышқылы оттектің активті формаларының сигналингіне және антиоксиданты ферменттердің белсенділігінің реттелуіне, *Solanum tuberosum*. - *Fusarium solani* жүйесінде өзара әсерлесу сипатын анықтайтын (үйлесімді - үйлесімсіз) тағы да басқа факторларға қатысады деген қорытынды жасалды.

Кілтті сөздер: картоп, жасуша культурасы, тұрақтылық, фузарий қышқылы, сутегі асқын тотығы, липидтердің сутегі асқын тотығу, тотығуға қарсы ферменттер.

Summary

Fusaric acid (FA) - a non-specific toxin produced by many species of *Fusarium*, a cause of diseases of plants. The production of reactive oxygen species (ROS) is one of the early plant responses to infection. It is known that many nonspecific phytotoxins induce ROS generation, and in cases, the development of symptoms can be explained by this mechanism. The influence of FA on antioxidant system shown for a number of plants. An earlier, we demonstrated that FA in a toxic and non-toxic doses induced components of pro- and antioxidant systems of potato suspension cells and could act as a signal function. The aim of this work was to study the effect of FA on the components of oxidative stress and antioxidant enzymes in suspension cells of potato with contrasting resistance to the *F. solani*.

The suspension cells derived from plant cultivars Aksor (relatively resistant) and Santa (sensitive) was used. The pro- and antioxidant systems were measured using the appropriate methods of spectroscopic analysis. The results showed that FA induced generation of hydrogen peroxide, lipid peroxidation, and modulate the activity of antioxidant enzymes in the suspension cells. The effect was dependent on the initial resistance of the cells. Level of H₂O₂ generation and lipid peroxidation caused by FA were higher in cells sensitive cultivars. In sensitive cells FA mainly induced extracellular form of superoxidedismutase, caused a rapid reversible induction of catalase and ascorbate peroxidase in the early phase of the stress response. In resistant cells FA in this phase activated the cytoplasmic form of superoxidedismutase, to inhibit the activity of extracellular and cytoplasmic catalase and induced ascorbate peroxidase at a late phase of the adaptive response. It is concluded that FA is involved in ROS-signaling and regulation of the activity of antioxidant enzymes, in the system *S. tuberosum*. - *F. solani*.

Keywords: potato, cell culture, resistance, fusaric acid, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, antioxidant enzymes.