

УДК 577.114:575.224

Богдан Ю. М., Буценко Л. М., Пасічник Л. А., Гвоздяк Р. І.

ВИВЧЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* 9400 У *ALLIUM* СЕРА-ТЕСТІ

Вивчено вплив ліпополісахариду (ЛПС) Pseudomonas syringae pv. atrofaciens 9400 на мітотичну активність та спонтанні хромосомні аберації у клітинах апікальної меристеми корінців Allium sera. ЛПС у концентраціях 10,0; 5,0 та 2,5 мг/мл зменшував мітотичний індекс, що свідчить про його токсичність у цих концентраціях. ЛПС P. syringae pv. atrofaciens 9400 характеризувався мутагенною активністю і збільшував кількість фрагментів хромосом у клітинах апікальної меристеми корінців A. sera у концентраціях 5,0 та 2,5 мг/мл. Низькі концентрації ЛПС (1,0 та 0,1 мг/мл) не впливали на кількість хромосомних аберацій у тест-організмі.

Ліпополісахариди (ЛПС) - унікальні біополімери, притаманні лише грамнегативним бактеріям і входять до складу зовнішньої мембрани їхніх клітин. У більшості грамнегативних бактерій ці сполуки мають однотипну будову і складаються з трьох основних частин: ліпиду А, корового олігосахариду та О-специфічного полісахариду. Молекулам ЛПС притаманні різноманітні біологічні властивості. Відомо, що вони

відіграють важливу роль у процесах інфікування та індукції захисних реакцій у рослин і тварин. ЛПС взаємодіють з клітинами макроорганізмів у складі клітин бактерій або у вільному стані [1].

Вплив ЛПС на клітини тварин вивчено достатньо добре. Так, відомо, що ці біополімери індукують гуморальну відповідь - продукцію природних антитіл і активацію комплементу [2]. У тварин на перших етапах інфікування

відбувається взаємодія ЛПС з ЛПС-зв'язувальним білком у плазмі крові або зі спеціальними рецепторами на поверхні клітин хазяїна. Наприклад, ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* відповідає за зв'язування клітин бактерій з трансмембранним регулятором кістозного фіброзу на поверхні епітеліальних клітин [3] і з толл-подібним рецептором TLR4 на поверхні макрофагів [4]. Зв'язування ЛПС з рецепторами на поверхні ендотеліальних клітин індукуює експресію ряду генів та активує утворення низки сигнальних молекул і активних форм кисню. Добре відомою є і здатність ЛПС спричинювати пошкодження ДНК у клітинах тварин [5]. Такий ефект може бути наслідком підвищення інтенсивності утворення кисневих радикалів. Зокрема Abd-Allah A. R. A. показав, що введення шуром ЛПС у дозі 5 мг/кг призводило до підвищення вмісту 8-гідроксидезоксигуанозину (маркера оксидативного пошкодження ДНК) у клітинах печінки у 4 рази [6].

На відміну від добре вивченого впливу ЛПС на клітини тварин, ефекти дії цієї макромолекули на рослинні клітини вивчено ще недостатньо. Встановлено, що у культурі клітин сої не було виявлено індукування оксидативного стресу та активації ліпооксигенази за участю ЛПС [1]. Водночас ЛПС *Ralstonia solanacearum* активував розчинну пероксидазу у клітинах тютюну [1]. Аналогічні результати одержано і у дослідях з червоною водорістю *Chondrus crispus*, у якій за участю ЛПС *Salmonella mortus-equi* спостерігали активацію двох ізоформ бромпероксидази [7]. Мейер А. та співавтори показали, що ЛПС *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* може індукувати оксидативний стрес у листі тютюну [8]. Однак здатність ЛПС спричинювати пошкодження генетичного матеріалу у рослинних клітинах не досліджувалася.

Метою нашої роботи було вивчення впливу ЛПС фітопатогену *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* 9400 на мітотичну активність та кількість хромосомних аберацій у *Allium cepa*-тесті.

Матеріали та методи дослідження

Для досліджень використовували штам 9400 *P. syringae* pv. *atropfaciens* (McCulloch 1920) Young et. al. 1978, який було ізольовано з ураженого листа пшениці ярої сорту Рання 93.

ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* 9400 одержували екстракцією 0,85 %-м розчином хлориду натрію [9]. Вміст білків в одержаному препараті визначали за методом Лоурі [10], вуглеводів - фенольно-сірчанним методом [9], 2-кето-3-дезоксид-D-манно-октонової кислоти (КДО) - у реакції з тіобарбітуровою кислотою [9], сумарний вміст нуклеїнових кислот - за методом Спіріна [11].

Як тест-систему на мутагенність використовували загальновідомий *Allium cepa*-тест за модифікацією [12]. У дослідженнях використано однорічне комерційне насіння *A. cepa* сорту Халцедон (ТОВ «Агромедсервіс»).

Для вивчення фітотоксичності насіння цибулі пророщували у розчинах досліджуваних речовин протягом 96 годин [12]. Для аналізу використовували шість концентрацій ЛПС - 10,0; 5,0; 1,0; 0,1; 0,01 та 0,001 мг/мл. У контрольному варіанті досліду насіння пророщували у дистильованій воді. Розчини та воду замінювали кожної доби на свіжі. Через 96 годин після початку пророщування вимірювали довжину кожного корінця пророщеного насіння та визначали залежність між концентрацією ЛПС та довжиною корінців, виражених у відсотках від контролю. Концентрацію, при якій спостерігається зменшення довжини корінців на 50 % порівняно з контролем (EC₅₀), визначали на графіку шляхом інтерполяції.

Для проведення цитогенетичних досліджень використали п'ять концентрацій ЛПС - 10,0; 5,0; 2,5; 1,0 та 0,1 мг/мл. Насіння *A. cepa* послідовно пророщували у дистильованій воді протягом 48 годин та 24 годин у розчині ЛПС. Фіксували корінці у суміші етанол-оцтова кислота (3:1) протягом доби [13]. Корінці, відмиті від фіксатора у 80 %-му етанолі (тричі по 2 години), мацерували у 1н HCl протягом 30 хвилин і забарвлювали 1 % оцетоорсеїном. Цитогенетичний аналіз проводили на тимчасових препаратах апікальної меристеми корінців. Визначали кількість ана-телофаз з хромосомними абераціями (фрагментами та мостами) та без пошкоджень хромосом. Аналізували 10 корінців *A. cepa* та не менше 100 ана-телофаз у кожному варіанті досліду. Для визначення мітотичного індексу (МІ) підраховували кількість клітин на різних фазах мітозу у 10 випадково вибраних полях зору. Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою тесту ANOVA у програмі Statistica 5.0.

Результати та їх обговорення

Пшениця - важлива сільськогосподарська культура. Вивчення впливу фітопатогенних бактерій на рослини пшениці є актуальним. Саме тому для досліджень нами було обрано патогенний штам для цього виду рослин.

Препарат ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* 9400, одержаний екстракцією 0,85 %-им розчином хлориду натрію, містив 30,7 % вуглеводів та 27,7 % білків (табл. 1). Високий вміст білків в одержаному препараті ЛПС обумовлений тим, що з клітин *P. syringae* екстракцією 0,85 %-им розчином хлориду натрію виділяється ЛПС-білковий комплекс зовнішньої мембрани. Також

препарат ЛПС містив 2,3 % нуклеїнових кислот та 1,7 % КДО. Відомо, що КДО - специфічна кислота, яка зустрічається виключно у складі ЛПС і, отже, є індикатором наявності цього біополімеру у препаратах.

Таблиця 1. Хімічний склад препарату ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400

Вміст окремих компонентів, % від сухої маси препарату ЛПС			
вуглеводи	білок	КДО	нуклеїнові кислоти
30,7	27,7	1,7	2,3

Нами показано, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 є фітотоксичним для *A. cepa* лише у великих концентраціях. Так, у концентрації 5 мг/мл ЛПС зменшував ріст корінців цибулі на 26 %. У концентрації 1 мг/мл ЛПС не впливав на ріст корінців цибулі, в концентраціях 0,1; 0,01 та 0,001 мг/мл стимулював їхній ріст на 20-30 %, тобто ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 належить до фізіологічно-активних речовин. Одержані нами результати щодо стимулюючого впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 у невеликих концентраціях на ріст корінців *A. cepa* узгоджуються з даними літератури. Зокрема Яковлева Л. М. та співавтори показали, що обробка насіння томатів, огірків, капусти і пшениці 0,04 % розчинами ЛПС різних штамів *P. syringae* стимулювала проростання насіння [14]. Крім того, томати і огірки, які розвивалися з насіння, обробленого розчинами ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* та *P. syringae* pv. *tomato*, росли швидше та утворювали більше квіткових бруньок [14]. Отже, ЛПС різних штамів *P. syringae* у невеликих концентраціях можуть стимулювати ріст рослин.

Показник EC_{50} для використаного в роботі ЛПС становив 10 мг/мл (рис. 1). Rank J. [12] рекомендує для дослідження мутагенної активності використовувати такі концентрації досліджуваних речовин: EC_{50} , а також 50 %, 25 % та 10 % від показника EC_{50} . Нами для аналізу також було використано такі концентрації: 10,0; 5,0; 2,5; 1,0 мг/мл, а також 0,1 мг/мл.

Розчин ЛПС концентрацією 10 мг/мл був високотоксичним для насіння *A. cepa*. За цих умов пророщування мітотичний індекс у апікальній меристемі корінців цибулі становив 14,6 % (табл. 2). Кількість анафаз та телофаз у корінцях цибулі, пророщених у розчині ЛПС концентрацією 10 мг/мл, була менше 100, тому кількість хромосомних аберацій у цьому варіанті досліджу не визначали. МІ у апікальній меристемі корінців цибулі за умов їх пророщування у розчинах ЛПС концентраціями 5,0 та 2,5 мг/мл був меншим за контрольний варіант (69,6 %) і становив 29,4 % та 37,3 % відповідно. МІ у клітинах кінчиків корінців цибулі, пророщених у розчині ЛПС концентрацією 1 мг/мл, був трохи вищим (74,7 %) за контрольний (69,6 %), а за умов пророщення насіння у розчині ЛПС концентрацією 0,1 мг/мл був дещо нижчим (61,1 %) за контрольний, і вони не мали статистично значущих відмінностей від контрольного показника. Отже, ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 концентрацією більше 1 мг/мл виявляв токсичну дію на пророщені корінці *A. cepa*, про що зокрема свідчать результати досліджень впливу розчину ЛПС на довжину корінців та мітотичну активність у клітинах апікальної меристеми корінців *A. cepa*.

Під час проведення аналізу впливу ЛПС на кількість хромосомних аберацій у *A. cepa*-тесті

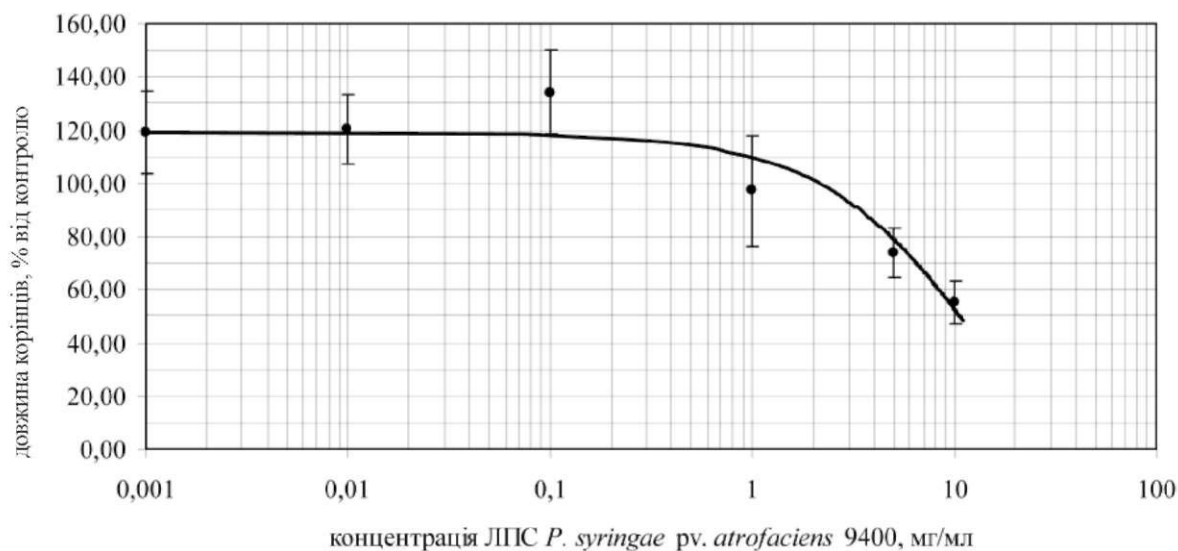


Рис. 1. Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на ріст корінців *A. cepa*

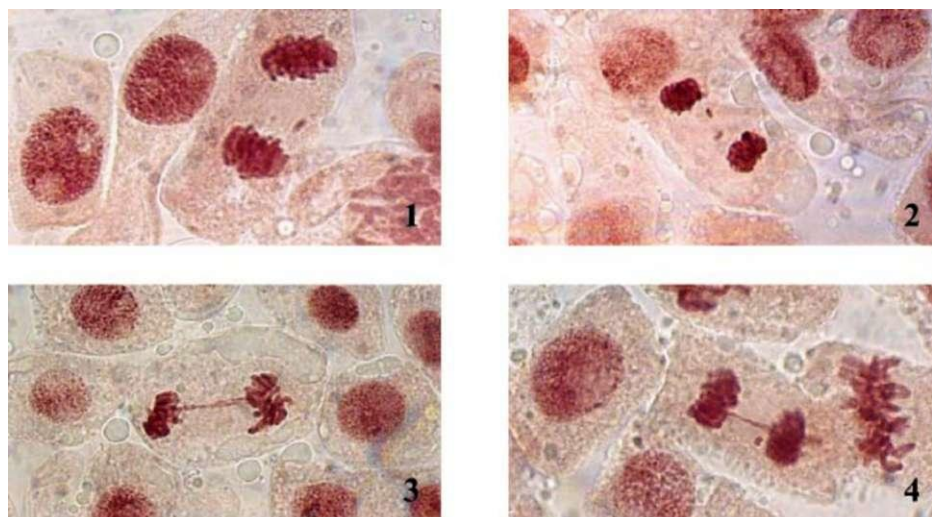


Рис. 2. Хромосомні аберації у клітинах апікальної меристеми корінців *A. cepa* на стадії телофази: 1 - одинарний фрагмент, 2 - подвійний фрагмент, 3 - міст, 4 - міст та фрагмент

Таблиця 2. Кількість аберантних ана-телофаз у апікальній меристемі *A. cepa* при дії ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400

Концентрація ЛПС, мг/мл	Вивчено ана-телофаз	Кількість аберантних ана-телофаз, %	Кількість ана-телофаз з:		МІ, ‰
			фрагментами, %	мостами, %	
10,0	-	-	-	-	14,6 ± 7,02
5,0	430	16,4 ± 4,1	11,6 ± 1,17	2,8 ± 1,71	29,4 ± 3,55
2,5	329	13,4 ± 1,3	9,0 ± 1,20	4,0 ± 1,99	37,3 ± 10,41
1,0	520	5,2 ± 0,8	2,3 ± 0,67	4,5 ± 1,85	74,7 ± 3,01
0,1	539	7,1 ± 1,4	3,2 ± 2,78	3,3 ± 0,88	61,1 ± 7,19
Контроль	459	6,6 ± 1,9	3,5 ± 1,89	3,4 ± 1,43	69,6 ± 11,56

підраховували клітини з двома видами аберацій - фрагментами та мостами (рис. 2.). Пророщування насіння цибулі у розчинах ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 концентраціями 5,0 та 2,5 мг/мл підвищувало кількість аберантних ана-телофаз, яка становила 16,4 % та 13,4 % відповідно, тоді як у контролі цей показник становив 6,6 % (табл. 2). У насіння, пророщеного в розчинах ЛПС концентраціями 1,0 та 0,1 мг/мл, було 5,2 % та 7,1 % аберантних ана-телофаз, що не мало статистично значущих відмінностей від аналогічного показника у контролі. Серед аберацій у клітинах корінців *A. cepa*, які виростили у розчинах ЛПС концентрацією 5,0 та 2,5 мг/мл, переважали фрагменти. Так, у цьому варіанті дослідження кількість фрагментів становила 11,6 % та 9,0 % відповідно, тоді як за умов дії двох найнижчих концентрацій ЛПС (1 і 0,1 мг/мл) та у контрольному варіанті дослідження цей показник коливався у межах 2-3 %. Кількість мостів не мала статистично значущих відмінностей від контрольного показника в усіх варіантах дослідження, хоча за умов дії ЛПС у концентраціях 2,5 та 1 мг/мл цей показник був де-що вищий.

Раніше нами було вивчено дію ЛПС різних штамів *P. syringae* на кількість спонтанних мутацій у *Salmonella typhimurium* у тесті Еймса [15, 16, 17]. Було встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, як і інших штамів *P. syringae*, не впливав на кількість мутацій у тест-штамів *S. typhimurium* TA98 і *S. typhimurium* TA 100. Отже, у бактеріальній тест-системі, на відміну від еукаріотичної, цей біополімер не виявляв мутагенної активності.

Таким чином, ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 характеризувався мутагенною активністю у *A. cepa*-тесті і збільшував кількість хромосомних аберацій у клітинах апікальної меристеми корінців цибулі у концентраціях 5,0 та 2,5 мг/мл у 2,5 та 2 рази відповідно. Низькі концентрації ЛПС (1,0 та 0,1 мг/мл) не впливали на кількість хромосомних аберацій у тест-організмі, високі (10 мг/мл) - були токсичними. Відкритим залишається питання щодо механізму мутагенного впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на клітини корінців цибулі. Цілком імовірно, що цей ефект може бути опосередкований окислативним стресом. Проте підтвердження чи спростування цього факту потребує подальших досліджень.

1. Newman M.-A., Dow J. M., Daniels M. J. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions // *European Journal of Plant Pathology*. - 2001. - Vol. 107. - P. 95-102.
2. Воробьев А. А., Борисова Е. В., Борисов В. А. Липополисахариды грамотрицательных вирулентных бактерий и их роль в инфекции и иммунитете // *Вестник Рос. АМН*. - 1997. - № 3. - С. 10-13.
3. Pier G. B., Grout M., Zaidi T. S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung // *PNAS*. - 1997. - Vol. 94. - P. 12088-12093.
4. Hajjar A. M., Ernst R. K., Tsai J. H. et al. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications // *Nature Immunology*. - 2002. - Vol. 3. - № 4. - P. 354-359.
5. Suliman H. B., Carraway M. S., Piantadosi C. A. Postlipopolysaccharide Oxidative Damage of Mitochondrial DNA // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. - 2003. - Vol. 167. - P. 570-579.
6. Abd-Allah A. R. A. Alpha-lipoic acid counteracts the promoted oxidative dna damage in the liver of septic rats // *Saudi Pharmaceutical Journal*. - 2006. - Vol. 14. - № 2. - P. 89-99.
7. Weinberger F. Pathogen-Induced Defense and Innate Immunity in Macroalgae // *Biol. Bull.* - 2007. - Vol. 213. - P. 290-302.
8. Meyer A., Pühler A., Niehaus K. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum* // *Planta*. - 2001. - Vol. 213. - № 2. - P. 214-222.
9. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. - К.: Наук. думка, 1982. - 192 с.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* - 1951. - Vol. 193. - № 1. - P. 265-275.
11. Спири А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // *Биохимия*. - 1958. - Т. 23. - № 5. - С. 656-662.
12. Rank J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay // *Ekologija (Vilnius)*. - 2003. - № 1. - P. 38-42.
13. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. - М.: Колос, 1974. - 288 с.
14. Яковлева Л. М., Здорovenko Г. М., Шербина Т. М. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas syringae* на резистентність рослин до фітопатогенів // *Вісник Одеського національного університету*. - 2005. - Т. 10. - Вип. 7. Біологія. - С. 317-321.
15. Богдан Ю. М., Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Ващенко Л. М. Вивчення мутагенної активності ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 у тесті Еймса // Міжнарод. наук. конференція «Екологізація сталого розвитку агросфери і ноосферна перспектива інформаційного суспільства» (Харків, 3-5 жовтня, 2007): Матеріали конференції. - Харків, 2007. - С. 206.
16. Ващенко Л. М., Пасічник Л. А., Гвоздяк Р. І. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на спонтанні та індуковані біхроматом калію мутації у *Salmonella typhimurium* // *Біополімери і клітина*. - 2004. - Т. 20. - № 4. - С. 295-299.
17. Гвоздяк Р. І., Ващенко Л. М., Пасічник Л. А. Генотекторна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9030 // *Доповіді НАНУ* - 2003. - № 4. - С. 159-162.

Y. Bogdan, L. Butsenko, L. Pasichnyk, R. Gvozdyak

THE STUDY OF MUTAGENICITY OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* 9400 LIPOPOLYSACCHARIDE IN *ALLIUM CEPA*-TEST

The effect of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 lipopolysaccharide (LPS) on the mitotic activity and spontaneous chromosome aberration in cells of *Allium cepa* root apical meristem was studied. LPS at concentrations 10,0; 5,0 and 2,5 mg/ml reduced mitotic index, that indicated its toxicity. *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 LPS revealed mutagenicity and increased the number of fragments in cells of *A. cepa* root apical meristem at concentrations 5,0 and 2,5 mg/ml. The low concentrations of LPS (1,0 and 0,1 mg/ml) did not affect the number of chromosome aberration in test-organism.