

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО СПЕЦИФІЧНОГО ЛЕКТИНУ НА ЛЕКТИНОВУ АКТИВНІСТЬ У ПРОРОСТКАХ ТА ЛИСТКАХ ПШЕНИЦІ

О. В. КИРИЧЕНКО, О. М. ТИЩЕНКО

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ;
e-mail: azot@ifrg.freenet.kiev.ua*

Изучали влияние предпосевной обработки яровой пшеницы специфичным экзогенным лектином, полученным из пшеничных зародышей (препаратом фирмы «Лектинотест», Львов), на эндогенную лектиновую активность и содержание РНК в вегетативных органах растений. Установлена вариабельность лектиновой активности в проростках и листьях пшеницы. Показано, что под влиянием экзогенного лектина в листьях увеличивается как эндогенная лектиновая активность, так и содержание РНК. Этот эффект его действия частично ингибируется гаптенем. Обсуждается возможность индукции изменений эндогенного лектинового пула и функциональной активности генома пшеницы экзогенным лектином.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лектин, лектиновая активность, гаптен, РНК, пшеница, листья, проростки.

Лектини належать до класу білків неімунного походження, які здатні оборотно та вибірково зв'язувати вуглеводи, не спричинюючи їхнього хімічного перетворення [1–4]. Вони можуть взаємодіяти як з моно-, так олігосахаридами, а також із залишками вуглеводів у складних органічних сполуках – глікопротеїнах, полісахаридах та глікозидах. Вуглеводи, які виявляють найбільшу спорідненість до того чи іншого лектину, є для них гаптенами [1, 5].

Лектини – це полівалентні ліганди, в молекулах яких є, як правило, два або чотири центри зв'язування вуглеводів [1, 3, 5]. Значна кількість лектинів міститься в насінні, де їхній рівень досягає 10–15% загального вмісту запасних білків [1, 2]. Вони також виявлені у вегетативних та генеративних органах рослин [2, 4, 6].

Рослинні лектини належать до поліфункціональних білків із широким спектром біологічної активності [1, 2]. Відомо, що в разі екзогенного оброблення ними насіння спостерігається стимуляція росту і розвитку рослин та підвищення їхньої продуктивності [7, 8], однак механізм такої дії лектинів не з'ясовано. Згідно з нашим припущенням, екзогенні лектини, сполуки білкової природи, здатні впливати на рівень та активність ендогенного лектинового пулу у тканинах, індукуючи зміни у функціональній активності генома, які пов'язані з експресією генів в онтогенезі рослин. Тому на початковому етапі розвитку пшениці ми вважали доцільним визначити такі показники, як гемаглютинувальна активність ендогенного лектину та вміст синтезованої у тканинах вегетативних органів пшениці РНК.

З огляду на наведені вище дані, метою роботи було вивчення впливу передпосівного оброблення зернівок специфічним комерційним екзогенним лектином пшениці, виділеним із зародків, на лектинову активність і вміст РНК у вегетативних органах (проростках та листках) пшениці. Для доказу лектинової природи індукції змін кількості РНК і ендогенній лектиновій активності тканин зернівки обробляли композицією комерційного препарату лектину та гаптену (N-ацетил-β-глюкозаміном).

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була яра пшениця (*Triticum aestivum* L.) сорту Колективна 3, яку вирощували в умовах вегетаційного досліду на ґрунтовому субстраті. Зернівки перед посівом обробляли лектином пшениці (комерційним препаратом АЗП – аглютиніном зародків пшениці – фірми «Лектинотест», Львів) у концентрації 10 мкг/мл та композицією лектин (АЗП) + гаптен. Як гаптен використовували 0,1 М N-ацетил-D-глюкозамін («Лектинотест», Львів). У лабораторних дослідах зернівки обробляли розчинами лектину пшениці в концентраціях 5, 10 і 20 мкг/мл, після чого їх пророщували. Контролем слугували рослини, зернівки яких обробляли водою.

Лектини екстрагували 76%-м етанолом із 7-денних проростків пшениці та з листків пшениці у фазі трубкування методом, наведеним у роботі [9]. Вміст білка у препаратах визначали як описано у статті [10], лектинову активність – за реакцією гемаглютинації з еритроцитами люди-

ни групи крові I [1]. Величину, обернену до титру аглютинації, вважали фактичною лектиноювою активністю, яку виражали в одиницях аглютинації (ОА) в 50 мкл розчину (ОА/50 мкл). Питому лектинову активність, що, як і титр аглютинації, є відносним показником кількісного вмісту лектину у зразках [4], визначали в ОА/мг білка. Вплив специфічного екзогенного лектину на лектинову активність у проростках (в колеоптилях) та листках під час виходу рослин у трубку оцінювали за зміною її порівняно з контролем – обробленням зернівок водою.

Вміст РНК у листках в період трубкування пшениці визначали методом F. Nagy et al. [11]. На 1 г тканини, гомогенізованої в рідкому азоті, для екстракції нуклеїнової кислоти додавали 5 мл буфера, що містив 300 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (рН 8,0), 5 мМ ЕДТА, 2% Ds-Na, 10 мМ β-меркаптоетанолу та 1 мМ ауристрикарбонової кислоти. До розмороженого при 50 °С екстракту вносили 0,7 мл 3 М KCl, після чого суміш 20 хв інкубували при 0 °С. Гомогенат центрифугували (10 хв, 10 000 g) на мікроцентрифузі («Beckman», США). До супернатанту вводили 2,5 мл 8 М розчину LiCl, РНК осаджували при 4 °С протягом 12–16 год. Пробу центрифугували (10 хв при 10 000 g), осад розчиняли в 1 мл стерильної бідистильованої води. Розчин депротейнізували сумішшю хлороформ – ізоаміловий спирт (24 : 1, v/v) до зникнення інтерфази. До супернатанту додавали NaCl (кінцева концентрація 0,5 М), після чого РНК осаджували 2,5 об'ємами етанолу. Одержаний осад, двічі промитий 70%-м етанолом, висушували і розчиняли в 500 мкл стерильної бідистильованої води. Концентрацію рибонуклеїнової кислоти визначали при 260 нм на спектрофотометрі Spcord M 40 («Carl Zeiss», Німеччина). При цьому враховували, що 1 оптична одиниця є тотожною 43,5 мкг РНК. У роботі використовували Tris, ЕДТА, β-меркаптоетанол, Ds-Na, ацетат калію («Fluka», Швейцарія), ауристрикарбонову кислоту («Sigma», США); інші реактиви були вітчизняного виробництва.

Результати та обговорення

Дослідження гемаглютинувальної активності ендogenous лектину в листках пшениці (фаза виходу у трубку) за дії на зернівки АЗП свідчать про підвищення в них активності ендogenous лектину (табл. 1). При цьому значення питомої лектинової активності збільшується в 1,5 раза порівняно з контролем. Одержані результати віддзеркалюють довготривалість ефекту оброблення зернівок екзогенним лектином пшениці.

Крім того, нами виявлено, що рівень сумарної РНК в листках після оброблення зернівок АЗП збільшується майже в 2,5 раза (табл. 1). Оскільки кількість мРНК у клітинах еукаріот незначна, істотне підвищення загального вмісту її відбувається, переважно, за рахунок рРНК і тРНК. Однак це не виключає можливості безпосередніх змін у молекулах різних видів РНК під час трансляції, в т.ч. і мРНК лектинів. Можна припустити, що позитивні зміни морфологічних показників рослин при обробленні зернівок екзогенним лектином можуть бути пов'язані з варіабельністю реалізації генетичних програм розвитку їхніх вегетативних органів. Слід зазначити, що деякі інші біологічно активні речовини, як відомо, також здатні істотно впливати на функціонування генома рослин [4, 12,]. Так, наприклад, рівень РНК в листових пластинках столових буряків підвищується під впливом регулятора росту рослин емістиму С [12]. Під час проростання зернівок пшениці за присутності біологічно активної речовини ілу у проростках також було виявлено збільшення вмісту РНК та гемаглютинувальної активності лектину [4]. Отже, підвищення рівня РНК в листках, яке супроводжується збільшенням лектинової активності, свідчить, що екзогенні лектини здатні водночас індукувати зміни у сумарній кількості РНК та у вмісті ендogenous лектинів у пшениці.

Слід відзначити, що збільшення активності ендogenous лектинів унаслідок оброблення зернівок АЗП спостерігається на різних фазах розвитку пшениці – в 7-денних проростках фаза

Т а б л и ц я 1. Лектинова активність і загальна кількість РНК в листках пшениці у фазі виходу рослин у трубку за дії на зернівки екзогенного лектину

Оброблення зернівок	Активність лектину			Кількість РНК	
	ОА/50 мкл	ОА/мг білка	% від контролю	мкг/г тканини	% від контролю
Водою (контроль)	16	197,3 ± 0,2	100	90,42 ± 5,46	100
Екзогенним лектином	32	304,6 ± 1,5*	154	220,31 ± 8,34*	244
Лектином + гаптемом	16	247,5 ± 3,5*	125	168,60 ± 8,97*	187

Тут і в табл. 2: ОА – одиниця аглютинації, * дані порівняно з контролем вірогідні, $p < 0,05$.

колеоптилей (табл. 2), і в листках – вихід рослин у трубку (табл. 1). Лектинова активність у проростків пшениці обумовлюється концентрацією АЗП і в 1,9–3,6 рази перевищує цей показник у контролі (оброблення насіння водою). Однак у листках під час виходу рослин у трубку порівняно з колеоптилями лектинова активність була значно вищою, що свідчить про істотні зміни її залежно від періоду розвитку пшениці. Відомо також [13, 14], що підвищення її відбувається вже на перших етапах проростання зернівок пшениці. Зниження вмісту в них лектину на першу добу росту та збільшення на 4–5-ту Н. Ф. Шакирова зі співавт. пов'язують із формуванням кореневої системи проростка [13]. N. V. Raihel et al. [15] також припускають, що значна варіабільність вмісту лектину у проростках пшениці зумовлюється утворенням коріння.

Аналіз як фактичної, так і питомої лектинової активності у тканинах надземної частини проростків пшениці і її коренях свідчить, що ефект дії препарату АЗП на зернівки залежить від його концентрації (табл. 2). При цьому на ранньому етапі розвитку пшениці максимальна лектинова активність спостерігається в коренях, а не в колеоптилях. Значення фактичної лектинової активності в коренях залежно від варіанту дослідження перевищує таку в колеоптилях у 2–4 рази. Різниця питомої лектинової активності між цими частинами проростків становить 2,4–3,9 рази. Найвираженішою вона була в тих варіантах дослідження, в яких зернівки обробляли екзогенним лектином у концентрації 10 і 20 мкг/мл. Зазначена процедура стимулює лектинову активність у коренях по-

рівняно з контролем у 1,9–5,5 рази. Таким чином, дія на зернівки екзогенного лектину пшениці зумовлює посилення ендогенної лектинової активності як у надземній частині рослин, так і в коренях.

Відомо, що понад 50% лектинів злакових культур локалізується саме в коренях [16, 17]. Показано, що в коренях пшениці міститься лектин, який за своїми властивостями не відрізняється від комерційного препарату АЗП [18]. При цьому встановлено, що в зародках пшениці і в коренях рослин лектин виявлено в тих клітинах, які безпосередньо контактують із ґрунтом. Так, у зрілих зародках пшениці він практично міститься в поверхневих шарах клітин зародкового кореня, перших адвентивних коренях, колеоптилі та щитку [18]. Встановлено [18], що лектин у поверхневих клітинах кінчика бічних коренів та чохлака 2-місячних рослин, відіграє істотну роль у взаємодії рослини з бактеріями [19], які заселяють поверхню кореневої системи, колонізуючи тканини, або знаходяться в ризосферному ґрунті.

Корінь є основним постачальником елементів живлення в органи рослин. Висока лектинова активність, яку ми спостерігали на початкових етапах розвитку коренів проростків, може свідчити про те, що ці сполуки, як транспортні білки [6, 17], здатні переносити поживні елементи в надземну частину рослини, забезпечуючи в такий спосіб активне формування органів на пізніх фазах росту.

Для виявлення лектинової природи індукції функціональних змін у геномі ми порівнювали

Т а б л и ц я 2. Зміна лектинової активності у проростках пшениці за дії екзогенного лектину на зернівки

Оброблення зернівок	Активність лектину		
	ОА/50 мкл	ОА/мг білка	% від контролю
<i>Наземна частина проростка</i>			
Водою	2	21,0 ± 0,1	100
Екзогенним лектином (мкг/мл):			
5	4	40,1 ± 0,9*	191
10	8	75,5 ± 1,4*	359
20	8	68,8 ± 0,2*	327
<i>Коріння</i>			
Водою	4	49,4 ± 0,0	100
Екзогенним лектином (мкг/мл):			
5	8	94,5 ± 0,1*	191
10	32	269,3 ± 0,6*	545
20	32	268,0 ± 0,6*	543

загальний вміст РНК і ендогенну лектинову активність у листках пшениці після оброблення зернівок сумішшю лектину з гаптенем. Відомо, що АЗП має чотири вуглеводзв'язувальні центри, яким притаманна висока спорідненість до олигомерів — N-ацетил-D-глюкозаміну та D-ацетилнейрамінової кислоти [5]. Зазначені речовини є гаптенами лектину пшениці. Під час взаємодії з ними лектин частково або повністю втрачає свою активність.

З одержаних нами результатів випливає, що в листках рослин, на насіння яких сумісно діяли лектином і гаптенем, загальна кількість РНК зменшується на 57% порівняно з варіантом дослідження, в якому зернівки обробляли лише лектином (табл. 1). Ці дані свідчать про те, що часткова втрата активності екзогенним лектином через зв'язування його з гаптенем зумовлює часткове зниження рівня РНК в листках. Проте слід зазначити, що вміст її не наближаються до значень у контролі. Це свідчить про збереження екзогенним лектином індукторної здатності. Той факт, що гаптен інгібує активність лектину пшениці та частково знімає його позитивний ефект на синтез РНК, є одним із доказів участі лектину в індукції змін у функціонуванні генома.

В разі оброблення зернівок пшениці композицією лектин + гаптен питома лектинова активність у листках рослин зменшується на 29% порівняно з дією на зернівки екзогенного лектину та збільшується на 25% відносно контролю (табл. 1). Отже, характер змін як лектинової активності, так і вмісту РНК в листках пшениці за сумісного оброблення зернівок лектином і гаптенем є аналогічним. З огляду на одержані нами результати, можна припустити, що пролонговану дію екзогенного рослинного лектину опосередковано варіабельністю активності ендогенного лектинового пулу у вегетативних органах. Не виключено також, що екзогенні лектини беруть участь у трансдукції сигналів на різних метаболічних шляхах.

Таким чином, оброблення зернівок екзогенним лектином пшениці підвищує лектинову активність та рівень синтезу РНК у рослині.

EFFECT OF EXOGENOUS SPECIFIC LECTIN ON LECTIN ACTIVITY IN THE WHEAT SEEDLINGS AND LEAVES

O. V. Kyrychenko, O. M. Tishchenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: azot@ifrg.freenet.kiev.ua

S u m m a r y

The effect of presowing treatment of wheat seeds by exogenous wheat lectin on endogenous activity of lectin as well as on RNA content in vegetative organs of wheat was investigated. The variability of lectin activity in the seedling and leaves of wheat plants was obtained. Both endogenous activity of lectin and RNA amount increase under the effect of exogenous lectin. This effect was partially inhibited by the hapten of the wheat lectin. The possibility of induction of modifications in both endogenous lectin pool and functional activity of plant genome by exogenous lectin is under discussion.

K e y w o r d s: lectin, lectin activity, hapten, RNA, wheat, leaves, seedling.

1. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины. Львов: Вища школа. 1981. 154 с.
2. Pustai A. Plant lectins. New York: Cambridge University Press. 1991. 348 p.
3. Маліченко С. М. Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом. К.: Логос. 2001. С. 5–56.
4. Ямалеєва А. А. Лектины растений и их биологическая роль. Уфа: РИЦ Башкирского унта. 2001. 202 с.
5. Антонюк Л. П., Игнатов В. В. // Физиол. растений. 2001. **48**, № 3. С. 427–433.
6. Owens R. A., Blackburn M., Ding B. // Mol. Plant – Microbe Interact. 2001. **14**, N 7. P. 905–909.
7. Кириченко Е. В., Титова Л. В., Жемойда А. В., Омельчук С. В. // Физиол. и биохим. культ. растений. 2004. **36**, № 5. С. 390–397.
8. Кириченко Е. В., Титова Л. В., Коць С. Я. и др. // Агрехимия. 2004. № 11. С. 58–62.

9. Вязов О. Е. Лабораторные методы исследований в неинфекционной иммунологии. М.: Медицина. 1967. 130 с.
10. Whitaker J. R., Einar G. // *Anal. Biochem.* 1980. **109**, N 1. P. 156–159.
11. Nagy F., Kay S. A., Nam-Hai Chua // *Plant Molec. Biology manual*. 1988. **V4**. P. 11–12.
12. Гуральчук Ж. З., Тищенко О. М. // *Доп. НАН України*. 2003. № 10. С. 171–175.
13. Шакирова Ф. М., Безрукова М. В., Хайрулин Р. М. // *Изв. РАН. Серия биол.* 1993. № 1. С. 142–145.
14. Феоктістов П. О., Григорюк І. П., Ляшок А. К. // *Физиол. и биохим. культ. растений*. 2002. **4**, № 3. С. 260–264.
15. Raikhel N. V., Mishkind M., Palevitz B. A. // *Planta*. 1984. **162**, N 1. P. 55–58.
16. Лахтин В. М. // *Биотехнология*. 1986. № 5. С. 66.
17. Марков Е. Ю., Хавкин Э. Е. // *Физиол. растений*. 1983. **30**, вып. 5. С. 852–867.
18. Mishkind M., Raikhel N. V., Palevitz B. A., Keegstra K. *Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins* / Ed. Alan R. N. J.: Liss Inc. 1983. P. 163–176.
19. Йосипенко О. А., Стадник Г. И., Игнатов В. В. // *Приклад. биохим. и микробиология*. 1996. **32**, № 4. С. 458–461.

Отримано 16.03.2005