

УДК 633.367:632.4

АКТИВАЦИЯ ЛЕКТИНОВЫХ БЕЛКОВ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ФИТОПАТОГЕННЫМ ГРИБОМ *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES*

*Кубарев В. С., ** Коваленок Ю.К., ***Щербаков Г.Г., ****Яшин А.В.

*РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», г. Жодино, Республика Беларусь

** УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

***ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург

Инфицирование растений узколистного люпина сортов Эдельвейс, Rancher, Marri, Wonga, Tanjil и Миртан фитопатогенным грибом Colletotrichum gloeosporiodes вызывает значимое ($P \leq 0,05-0,001$) возрастание гемагглютинирующей активности содержащихся в листьях лектинов по сравнению с неинфицированным контролем.

Infection of plant blue lupine varieties Edelweiss, Rancher, Marri, Wonga, Tanjil and Myrtana phytopathogenic fungus Colletotrichum gloeosporiodes is significant ($P \leq 0,05-0,001$) increase hemagglutinating activity in the leaves of lectins compared to uninfected control.

Введение. В условиях Республики Беларусь в производстве зернобобовых культур все большее значение приобретает люпин. Данная сельскохозяйственная культура обладает высоким содержанием белка в семенах, высокой азотфиксацией, а также способна произрастать в условиях умеренно-континентального климата. Согласно принятой систематике род *Lupinus* включает около 200 видов произрастающих в различных почвенно-климатических условиях. Однако сдерживающим фактором широкого внедрения этой культуры в сельскохозяйственное производство Республики Беларусь является восприимчивость сортов люпина к антракнозу, при эпифитотиях которого полностью гибнут его посевы [6].

К настоящему времени накоплен большой фактический материал об индукции в различных растительных объектах в ответ на инфицирование вирусами, бактериями и грибами синтеза многих PR-белков, в состав которых входят хитиназы, пероксидазы, туматинподобные белки, протеиназы, лектиновые белки [1]. Особый интерес представляет последняя группа белков - лектины. Лектины - это белки, не относящиеся к классу иммунных и ферментных, способные к обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов. В основе образования комплекса лектин-гликолиганд лежит явление комплементарности, т.е. пространственного соответствия молекул лектина и углеводной детерминанты друг другу. Исследователями было установлено, что многие лектины ингибируют прорастание спор фитопатогенных грибов, проявляя, таким образом, антифунгальные свойства [8].

Данные, касающиеся разнообразных лектинов в защите растений от патогенов, со всей убедительностью свидетельствуют о том, что эти белки, благодаря специфичности углеводным компонентам клеточных поверхностей фитопатогенов, могут играть важную роль в цепи формирования защитных реакций растений при инфицировании.

В последние десятилетия все страны мира, сеяющие люпин, столкнулись с опасной проблемой – антракнозом (ожоговой пятнистостью), которая ежегодно существенно снижает урожайность семян и зеленой массы, а в эпифитотийные годы полностью уничтожает посевы люпина. Республика Беларусь в этом плане не является исключением, антракноз люпина, вызываемый грибами *Colletotrichum gloeosporiodes* широко распространен [2].

Таким образом, изучение изменения активности лектинов растений люпина узколистного в результате инфицирования фитопатогенным грибом *Colletotrichum gloeosporiodes* является актуальным и производственно значимым.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследований использовались устойчивых к антракнозу сорта узколистного люпина выведенные в США и Австралии (Rancher, Marri, Wonga, Tanjil), а также сорт Белорусской селекции Миртан. Контролем выступал неустойчивый к фитопатогенному грибу *Colletotrichum gloeosporiodes* сорт Эдельвейс. Кроме того, дополнительным контролем служили растения сои (сорт Вилия), так как они не инфицируются расами указанного гриба, вызывающего антракноз люпина.

Биологическая активность исследуемых лектиновых белков устанавливалась по интенсивности реакции между лектинами и эритроцитами тест-системы. Данная реакция комплексообразования, в которой ядром комплекса выступают молекулы лектиновых белков выделенных из люпина узколистного, проводилась путем постановки серологической реакции гемагглютинации. В качестве лигандов, в вышеуказанной реакции, использовались стабилизированные эритроциты крупного рогатого скота (эритроцитарная тест-система) в концентрации форменных элементов $12,4 \cdot 10^{12}/л$. Подсчет количества эритроцитов в приготовленной тест-системе проводили посредством использования камеры с сеткой Горяева.

Забор цельной крови крупного рогатого скота для получения эритроцитов тест-системы проводился у клинически здоровых животных с соблюдением правил асептики и антисептики из яремной вены в стерильную пробирку с гепарином (2,0-2,5 Ед/мл). Из крови были получены стабилизированные эритроциты по общепринятой методике. Для повышения чувствительности эритроцитарной тест-системы использовались эритроциты, стабилизированные трипсином, это обеспечивает их сохранение довольно длительное время и препятствует образованию сгустков вызванных самоагглютинацией. Применение

эритроцитарной тест-системы позволяет выявлять взаимодействие лектинов люпина с эритроцитами крови в концентрации лектина 0,4 мкг/мл [4,7].

Активность всех исследуемых лектиновых белков определяли по общепринятой методике [7]. Количество белка определяли по методу Кьельдаля.

Семена исследуемых образцов были высажены в двух вариантах, опытном и контрольном:

1 – семена, предварительно инфицированные спорами и мицелием гриба *Colletotrichum gloeosporioides* - опытный,

2 – семена, не инфицированные спорами и мицелием гриба *Colletotrichum gloeosporioides* - контрольный.

В фазе появления первых настоящих листьев, а также во время цветения от растений был взят органический материал – листья для определения комплексообразующей активности в них содержащихся лектиновых белков. Экстракция лектинов из листьев проводилась водно-солевым методом [4]. Лектиновые белки, полученные в результате экстракции в дальнейшем, были исследованы на комплексообразующую активность с применением эритроцитарной тест-системы.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью специальных программных пакетов SAS 9.2, STATISTICA 9 и SPSS-19. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. Выбор критерия оценки значимости парных различий проверяли соответствием формы распределения нормальному, используя критерий χ^2 , а также контролировали равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. Проверка нормальности распределения вероятности количественных признаков осуществлялась также с помощью критерия Колмогорова и критерия Шапиро-Уилки. Применение указанных критериев показало, что более 80% всех количественных признаков в группах сравнения не имели нормального распределения. Поэтому для сравнения центральных параметров групп использовались непараметрические методы: дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с ранговыми метками Вилкоксона и критерий Ван дер Вардена, а также медианный критерий. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах проводилась оценка средних арифметических (M) и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего (m) и 95% доверительного интервала (95% ДИ) выборочных средних.

Результаты исследований. Проведенные исследования показали, что в случае инфицирования растений люпина узколистного патогенными расами гриба *Colletotrichum gloeosporioides*, вызывающего антракноз люпина, лектины, выделенные из листьев таких инфицированных растений, увеличивают свою комплексообразующую активность, активно реагируя с углеводными детерминантами эритроцитов тест-системы, образуя при этом стабильные эритроцитарные агрегаты.

В таблице 72 представлены данные по изменению комплексообразующей (гематглютинирующей) активности лектинов на разных стадиях роста растений люпина в зависимости от его сорта и контакта с возбудителем антракноза.

Таблица 72 - Изменение комплексообразующей активности лектинов в результате инфицирования грибом *Colletotrichum gloeosporioides* M±m, P

№ п/п	Исследуемые образцы	Фаза первых настоящих листьев		P (НИ – И)	Фаза бутонизации		P (НИ – И)
		Растения			Растения		
		НИ	И		НИ	И	
1	Эдельвейс	2,2±0,6	2,9±0,6	–	2,8±0,6	3,8±0,2	–
2	Rancher	20,6±1,3	34,4±3,6	***	23,6±1,3	41,2±3,2	***
3	Marri	14,6±1,2	21,6±2,7	*	17,3±1,2	23,8±2,3	**
4	Wonga	17,8±0,9	22,9±1,9	*	19,7±0,9	27,5±1,8	***
5	Tanjil	18,1±1,7	24,2±2,1	**	21,1±1,7	28,7 ±2,9	*
6	Миртан	3,2±0,4	3,4±0,8	–	4,5±0,4	4,9±0,7	–
7	Соя Вилия	21,7±2,8	21,7±2,9	–	21,0±2,8	21,6±2,4	–

Примечание:

1) НИ – неинфицированные растения; И – инфицированные растения;

2) – «P (НИ-И)» – результаты проверки гипотезы о равенстве межгрупповых средних у сортов между не инфицированными и инфицированными растениями посредством оценки значения параметрического F-критерия Фишера и непараметрических критериев Ван дер Вардена, Краскала-Валлиса и медианного критерия;

3) *, **, *** – P < 0,05, 0,01, 0,001 – соответственно.

Фаза бутонизации является очень важным этапом в жизни созревающего растения, так как именно на этом этапе происходит формирование генеративных органов и соответственно подготовка организма растения к дальнейшему размножению. Согласно данным исследователей в эту фазу у растений в зависимости от видовой принадлежности происходит как увеличение синтеза PR-белков, так и стабилизация этого синтеза. Также отмечено, что в некоторых случаях даже наблюдается уменьшение концентрации или активности хитинузнающих лектинов, хитиназ и других белков, выполняющих защитные функции [9].

При изучении изменения активности лектинов в стадии бутонизации люпина узколистного было отмечено, что их активность у неинфицированных и инфицированных растений неодинакова. Для каждого из вариантов наблюдается некоторое увеличение активности лектинов по сравнению с предыдущей

фазой (таблице 72). Однако активность лектинов в опытной и контрольной группах различалась значительно ($P \leq 0,05-0,001$), и снижения активности лектинов у опытных растений не наблюдалось, наоборот, она возрастала. На наш взгляд, это можно объяснить усилением их синтеза *de novo*. Так как лектины способны к переключению функций и кроме защитных свойств также участвуют в переносе веществ по флоэме, можно предположить, что увеличение активности белков лектинового типа необходимо растению для обеспечения формирующихся бутонов дополнительными питательными веществами, а также в защите от насекомых – вредителей и возбудителей болезней. Таким образом, увеличенная активность лектинов в формирующихся бутонах, в свою очередь, будет способствовать нормальному созреванию семян.

Результаты проведенных нами исследований также показывают, что максимальное увеличение активности лектинов по достижении растениями фазы бутонизации вновь наблюдалось у люпина зарубежных сортов. Как и в предыдущих случаях, самыми активными лектинами были лектины сорта Rancher, выведенного селекционерами США, активность которых у неинфицированных растений в эту стадию роста балансировала в 95% ДИ от 21,06 до 26,14 ЕА/50 мкл. Кроме того, высокой (19,7-21,1 ЕА/50 мкл) активностью обладали лектины контрольных растений таких австралийских сортов, как Wonga и Tanjil.

Лектины контрольных (неинфицированных) растений сортов белорусской селекции на стадии бутонизации имели значимо (на 77-86%) более низкую комплексообразующую активность, которая для сорта Миртан лежала в 95% ДИ от 3,72 до 5,28 ЕА/50 мкл, а для сорта Эдельвейс от 1,63 до 3,97 ЕА/50 мкл.

Отмечено, что активность лектинов опытных растений значимо ($0,05-0,001$) отличалась от контрольных. Важным является то, что в фазу бутонизации лектины инфицированных растений люпина имели более высокую активность по сравнению с таковой на стадии первых настоящих листьев.

Лектины листьев как изучаемых образцов люпина, так и листьев сои, активно вызывали гемагглютинацию эритроцитов тест-системы. Однако гемагглютинирующая активность лектинов значительно колебалась в зависимости от сорта. Полученными результатами вновь отмечено, что наиболее активными гемагглютинидами показали себя лектины экстракта из листьев люпина сорта Rancher. Его гемагглютинирующая активность по сравнению с неинфицированным контролем возросла до 95% ДИ 34,9-47,47 ЕА/50 мкл. Лектины сорта Wonga на стадии бутонизации у инфицированных растений также увеличили свою активность до 95% ДИ от 23,9 до 31,0 ЕА/50 мкл. Лектины других сортов на этой стадии роста растения также были более активны, но их активность возросла не столь значимо.

Следует отметить, что такие сорта люпина узколистного, как Rancher, Marri Wonga, Tanjil согласно характеристикам сортов являются устойчивыми к возбудителю антракноза люпина – грибу *Colletotrichum gloeosporioides*. Нами в настоящей работе было выявлено высокая комплексообразующая активность лектинов листьев этих сортов. Причем инфицирование растений вызывало заметную активацию лектинов.

В то же время такие сорта, как Эдельвейс и Миртан, не устойчивы к антракнозу, а нами обнаружено, что комплексообразующая активность их лектинов очень низкая, и даже в случае инфицирования растений грибом *Colletotrichum gloeosporioides* значительно не увеличивается.

Исходя из этого, можно предположить, что активность лектинов люпина и устойчивость его сортов к антракнозу находятся в прямой зависимости.

Заключение. В результате проведенных исследований выявлено, что в ответ на инфекцию практически у всех растений люпина происходит значимое увеличение активности лектинов. Наиболее активными при этом являются лектины листьев сорта Rancher, Wonga и Tanjil, наименее активны – лектины люпина сортов Миртан и Эдельвейс.

В настоящее время функция фитолектинов в ответе растения на воздействие фитопатогена неясна, однако экспериментально полученная значимая активация белков данного класса в ответ на инфицирование растения позволяет предполагать важную роль фитолектинов в защите организма растений люпина от патогенов.

Литература. 1. Валуева, Т. А. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений/ Т.А. Валуева // Успехи биологической химии. – 2002. – Т.42. – С.193–216. 2. Евсиков, Д.О. Антракноз люпина и его вредоносность / Д.О. Евсиков // Защита растений : сборник научных трудов / Белорусский научно-исследовательский институт защиты растений. – Минск, 2000. – Вып.19/23. – С. 128-136. 3. Игнатов, В.В. Углеводородные белки - лектины/ В.В. Игнатов// Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 2.– С.14–20. 4. Корсун, В.Ф. Фитолектины – руководство по клинической фитотерапии : учеб. пособие для вузов / В.Ф. Корсун, В.М. Лахтин, Е.В. Корсун. – М.: Высш.шк., 2007.– 273 с. 5. Кубарев, В.С. Изучение реакции агглютинации лектинов зерновых и бобовых культур с микроорганизмами - возбудителями желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных. / В.С. Кубарев, М.П. Шишлов // Известия Национальной Академии Наук, –2006.– № 5 (доп. выпуск)– С.105–107. 6. Купцов, Н.С. Потенциал люпина заслуживает более пристального внимания /Белорусское сельское хозяйство// Н.С. Купцов, И.И.Борис, 2009. – № 2. – С.40-41. 7. Луцк, М.Ф. Лектины/ М.Ф. Луцк, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцк// Львие: Вища школа, 1981. – 150 с. 8. Шакирова, Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция/ Ф.М. Шакирова.– Уфа: Гилем, 2001. – С.24-31. 9. Шакирова, Ф.М. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений/ Ф. М. Шакирова, М. В. Безрукова// Журнал общей биологии, 2007. – Т. 68. – № 2, Март-Апрель. С. 109-125.

Статья передана в печать 03.09.2012 г.