

Литература. 1. Ковалёнок, Ю. К. Микроэлементозы крупного рогатого скота и свиней в Республике Беларусь : монография / Ю. К. Ковалёнок. – Витебск : ВГАВМ, 2013. – 196 с. 2. Причины и патогенез акушерской патологии у высокопродуктивных коров / С. П. Хомын [и др.] // Научный вестник ЛНУВМБ имени С. З. Гжицкого. 2008. № 3. т. 10. С. 270-273. 3. Стефанюк, В. Ю. Взаимосвязь между некоторыми биохимическими показателями крови сухостойных коров и характером течения третьей стадии родов и послеродового периода у коров. / В. Ю. Стефанюк // Научный вестник ЛНУВМБ им.С. З. Гжицкого. 2009. №2. т. 11. С. 409-413. 4. Стефанюк, В. Ю., Стравский, Я. С., Кобылюх, И. Б. Суппозитории с содержанием наночастиц Ферума в коррекции антиоксидантной защиты организма коров после отела. / В. Ю. Стефанюк, Я. С. Стравский, И. Б. Кобылюх // Научный вестник ЛНУВМБ им. Гжицкого. 2017. № 82. т.19.С.201-204. 5. Хомын, С. П. Распространение и виды акушерской патологии у коров и система мер профилактики. / С. П. Хомын // Научный вестник ЛГАВМ. 2003. № 2. т.5. С.184-189. 6. Mordak, R., Nicpon, J. Hematologiczne i metaboliczne parametry krwi u krow w okresie okoloporodowym i wzrastajacej laktacji. / R. Mordak, J. Nicpon // "Medycyna Weterynaryjna". 2006. № 62. - P. 1292-1294. 7. Sheldon, I. M. Defining postpartum uterine disease in cattle / I. M. Sheldon // Theriogenology. 2006. № 65. - P. 1516-1530.

Статья передана в печать 16.10.2018 г.

УДК 577.112 : 573.6: 636

КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕКТИНОВ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО, КАК ФАКТОР ОТВЕТА НА ИНФИЦИРОВАНИЕ АНТРАКНОЗОМ

*Ковалёнок Ю.К., *Курдеко А.П., *Добровольский С.А., *Ковалёнок Н.П.,
Щербаков Г.Г., **Яшин А.В., *Кубарев В.С.

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

**ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

***ЧПУП «Будагово-биотехагро», г. Жодино, Республика Беларусь

Исследованиями установлено, что инфицирование люпина узколистного грибом *Colletotrichum gloeosporioides* приводит к 21-127% увеличению ($p < 0,05$) активности лектинов, особенно в фазу всхода растений, при этом отмечена выраженная сортоспецифичность в эффекте активации. Устойчивость растений люпина узколистного к антракнозу находится в зависимости от комплексообразующей активности содержащихся в них лектиновых белков. **Ключевые слова:** лектины, белки, люпин узколистный, антракноз.

COMPLEX-FORMING ACTIVITY OF THE NARROW-LEAVED LUPIN LECTINS AS A RESPONSE FACTOR ON THE ANTHRACNOSE INFECTION

*Kavalionak Y.K., *Kurdeko A.P., *Dabravolski S.A., *Kavalionak N.P., **Shcherbakov G.G., ***Kubarev V.S.

*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

**Saint Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

*** PMUE «Budagovo-biotechagro», Zhodino, Republic of Belarus

It has been shown by our research that infection of the narrow-leaved lupine by a fungus *Colletotrichum gloeosporioides* leads to an increase of 21–127% ($p < 0.05$) of lectin activity, especially during the germination phase of plants, with marked varietal specificity in lectins activation. The resistance of the narrow-leaved lupine plants to anthracnose depends on the complex-forming activity of the lectin proteins contained in them. **Key-words:** lectins, proteins, narrow-leaved lupine, anthracosis.

Введение. Обеспечение животных полноценным количеством и качеством белка продолжает оставаться актуальной проблемой для практикующих специалистов и задачей научных исследований для ученых [3-6, 7 и др.]. Интенсивный тип ведения животноводства, практикуемый в Республике Беларусь, и постепенный рост продуктивности животных, предполагают еще более строгий подход к нормированию компонентов рационов. В решении проблемы снижения дефицита белка огромная роль принадлежит зернобобовым культурам.

В Республике Беларусь с каждым годом все большее кормовое и агротехническое значение приобретает такая важная сельскохозяйственная культура, как люпин, который обладает высоким содержанием белка в семенах и хорошей азотфиксирующей способностью. Однако большой проблемой данной культуры является его высокое поражение антракнозом. Существующие лабораторные методы выявления маркерных белков устойчивости к тому либо иному заболеванию достаточно дороги и трудоемки и не всегда удобны при проведении селекционных работ, направленных на отбор по интересующим признакам устойчивости к какому-то заболеванию. В этом плане значительный интерес представляют лектины – белки, способные образовывать комплексы с углеводными лигандами, не нарушая ковалентную связь последних [2, 8].

В то же время применение методов иммунобиохимии при изучении изменения активности лектиновых белков весьма упростило бы работу, поскольку, согласно данным многих исследо-

вателей, активность лектинов и способность растения противостоять инфекции находятся в прямой зависимости [1, 9, 10 и др.].

Целью настоящей работы явилось изучение устойчивости люпина узколистного к антракнозу в зависимости от активности содержащихся в них лектинов.

Материалы и методы исследований. Исследования выполнены в РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», ЧПУП «Будагово-биотехарго» и УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» в течение 2013-2018 гг. В качестве объекта исследований использовались образцы (n=10) устойчивых к антракнозу сортов узколистного люпина, выведенных в США, Австралии, Германии, а также сорта Белорусской селекции. Контролем выступали растения люпина вышеуказанных сортов, неинфицированные фитопатогенным грибом *Colletotrichum gloeosporioides*.

Биологическая активность исследуемых лектинов устанавливалась по интенсивности серологической реакции гемагглютинации с использованием стабилизированных эритроцитов крупного рогатого скота (эритроцитарная тест-система) в концентрации форменных элементов $12,4 \cdot 10^{12}$ /л. Из цельной крови были получены стабилизированные эритроциты по общей методике [7].

Активность всех исследуемых лектиновых белков определяли методом обратного микротитрования [8]. Количество белка определяли по методу Кьельдала.

На разных фазах роста от опытных и контрольных растений был взят органический материал (листья) для определения комплексообразующей активности содержащихся в них лектиновых белков. Экстракция лектинов из органического материала проводилась методом водно-солевой экстракции. Биометрический анализ полученных данных осуществляли с помощью статистических пакетов SAS 9.2, STATISTICA 9 и SPSS-19.

Результаты исследований. Оценка комплексообразующей активности лектинов, экстрагированных из целых растений люпина узколистного на разной стадии роста, показала (таблица 1), что в зависимости от сорта способность лектинов взаимодействовать с эритроцитами тест-системы значительно различается.

Таблица 1 – Агглютинирующая активность (ЕА/50 мкл) лектинов, выделенных из растений люпина узколистного на стадиях «всходы» и «первые листья» (M±m, n=10)

Исследуемые образцы	Всходы		Р (НИ – И)	Фаза первых листьев		Р (НИ – И)
	Растения			Растения		
	НИ	И		НИ	И	
Rancher	20,3±1,2	31,3±2,1	***	24,4±1,2	33,1±2,1	***
Marri	17,2±0,2	24,7±1,2	***	19,8±0,5	26,3±1,2	***
Wonga	17,7±0,6	27,1±2,3	***	19,4±2,4	30,8±2,3	***
Tanji	18,1± 2,4	26,1±2,5	***	18,6±2,7	28,7±2,5	***
Эдельвейс	3,3±1,7	5,3±0,3	*	3,5±0,9	5,7±0,3	*
Миртан	7,3±0,8	12,3±1,4	***	9,2±0,9	14,8±1,4	***
Першацвет	12,9±0,1	22,2±2,1	***	19,4±1,6	21,6±2,1	***
Хвалько	8,6±1,1	13,4±1,6	**	8,9±1,3	11,1±1,6	**
Bordako	12,7±2,5	21,8±1,4	***	14,3±2,5	23,7±1,4	***
Borveta	11,8±1,6	23,8±1,4	***	14,4±2,4	22,9±1,4	***
Bora	14,1±2,7	26,1±2,7	***	16,7±1,2	25,7±2,7	***
Illyarrie	14,6±1,6	27,3±2,8	***	15,8±0,8	28,5±2,8	***
Гелена	11,2±0,2	24,8±1,4	***	13,7±1,1	22,6±1,4	***
Блакит	12,9±0,1	23,7±1,6	***	13,9±1,2	22,6±1,6	***
Пралеска	13,9±0,2	24,4±2,4	***	15,4±1,4	27,3±2,4	***
Митан	7,4±1,5	11,6±1,2	**	8,7±0,5	11,3±1,2	**
Глатко	16,6±0,2	27,7±2,1	***	17,8±1,8	29,2±2,1	***
Данко	6,2±1,1	10,2±1,1	**	7,4±0,1	11,8±1,1	**
Брестский	16,7±1,2	28,9±2,8	***	18,6±1,2	26,7±2,8	***
Надежда	2,8±0,6	3,4±0,4	*	3,1±1,2	3,2±0,4	*
Владлен	7,5±1,1	11,6±1,7	**	8,1±2,3	12,5±1,7	**
Ашчадны	3,6±0,8	5,1±0,5	*	4,2±0,4	4,3±0,5	*

Примечание: 1) НИ – неинфицированные растения; И – инфицированные растения; 2) «Р (НИ-И)» – результаты проверки гипотезы о равенстве межгрупповых средних у сортов между неинфицированными и инфицированными растениями посредством оценки значения параметрического F-критерия Фишера и непараметрических критериев Ван дер Вардена, Краскала-Валлиса; 3) *, **, *** – P < 0,05, 0,01, 0,001 – соответственно.

В таблице 1 представлены данные гемагглютинирующей активности лектинов люпина узколистного инфицированных (опытных) и неинфицированных (контрольных) растений в фазе всходов и первых листьев как белорусской селекции, так и сортов, выведенных зарубежными селекционерами. Отмечено, что разные сорта люпина узколистного имеют разную активность

лектиновых белков. Кроме того, активность лектинов опытных и контрольных растений даже в пределах одного сорта заметно различалась. На стадии всходов самой низкой комплексообразующей способностью обладали лектины люпина узколистного сорта Надежда (контроль), активность которых составила всего $2,8 \pm 0,6$ ЕА/50 мкл, а самую высокую активность у контрольных растений имели лектины сорта Rancher $20,3 \pm 1,2$ ЕА/50 мкл.

Всходы опытных растений имели более высокую активность лектинов по сравнению с контролем. Как и в случае с контрольными растениями, самыми активными гемагглютинами были лектины сорта Rancher, активность которых у инфицированных растений составила $31,3 \pm 2,1$ ЕА /50 мкл, а самой низкой активностью обладали лектины люпина сорта белорусской селекции – Надежда, активность которых составила $3,4 \pm 0,4$ ЕА /50 мкл.

Активное деление меристематических клеток и формирование различных органов и тканей требует от растения значительного увеличения биосинтеза многих веществ и их кумуляции, поэтому важным является вопрос о комплексообразующей активности лектинов в фазу появления первых настоящих листьев. Как видно из таблицы 2, значительного изменения активности лектиновых белков у различных сортов люпина узколистного в фазе первых настоящих листьев по сравнению со всходами не наблюдается.

Таблица 2 – Агглютинирующая активность (ЕА/50 мкл) лектинов, выделенных из растений люпина узколистного на стадиях «стеблевание» и «бутонизация» ($M \pm m$, $n=10$)

Исследуемые образцы	Стеблевание		Р (НИ – И)	Бутонизация		Р (НИ – И)
	Растения			Растения		
	НИ	И		НИ	И	
Rancher	$26,4 \pm 1,2$	$34,9 \pm 2,1$	**	$28,4 \pm 1,2$	$41,9 \pm 2,1$	***
Marri	$19,3 \pm 0,5$	$27,2 \pm 1,2$	**	$22,3 \pm 0,5$	$32,8 \pm 1,2$	***
Wonga	$22,4 \pm 2,4$	$32,7 \pm 2,3$	***	$25,4 \pm 2,4$	$34,8 \pm 2,3$	***
Tanji	$21,7 \pm 2,7$	$29,8 \pm 2,5$	**	$22,7 \pm 2,7$	$37,9 \pm 2,5$	***
Эдельвейс	$3,5 \pm 0,9$	$5,5 \pm 0,3$	*	$4,5 \pm 0,9$	$6,1 \pm 0,3$	*
Миртан	$10,2 \pm 0,9$	$15,6 \pm 1,4$	**	$13,2 \pm 0,9$	$18,4 \pm 1,4$	**
Першацвет	$18,2 \pm 1,6$	$23,3 \pm 2,1$	**	$19,2 \pm 1,6$	$29,8 \pm 2,1$	***
Хвалько	$9,1 \pm 1,3$	$15,1 \pm 1,6$	***	$12,1 \pm 1,3$	$24,7 \pm 1,6$	***
Bordako	$19,3 \pm 2,5$	$24,6 \pm 1,4$	**	$20,3 \pm 2,5$	$28,2 \pm 1,4$	**
Borveta	$20,8 \pm 2,4$	$24,9 \pm 1,4$	**	$23,8 \pm 2,4$	$26,5 \pm 1,4$	*
Boza	$19,7 \pm 1,2$	$25,9 \pm 2,7$	**	$19,9 \pm 1,2$	$29,1 \pm 2,7$	**
Ilyarrie	$17,8 \pm 0,8$	$29,3 \pm 2,8$	***	$19,8 \pm 0,8$	$32,7 \pm 2,8$	***
Гелена	$16,4 \pm 1,1$	$24,1 \pm 1,4$	***	$18,4 \pm 1,1$	$28,4 \pm 1,4$	***
Блакит	$15,9 \pm 1,2$	$23,3 \pm 1,6$	**	$17,9 \pm 1,2$	$27,5 \pm 1,6$	***
Пралеска	$15,4 \pm 1,4$	$29,2 \pm 2,4$	***	$17,4 \pm 1,4$	$35,6 \pm 2,4$	***
Митан	$9,7 \pm 0,5$	$12,8 \pm 1,2$	**	$10,7 \pm 0,5$	$21,3 \pm 1,2$	***
Глатко	$22,8 \pm 1,8$	$29,9 \pm 2,1$	**	$23,9 \pm 1,8$	$37,8 \pm 2,1$	***
Данко	$8,4 \pm 0,1$	$12,7 \pm 1,1$	**	$8,8 \pm 0,1$	$26,7 \pm 1,1$	***
Брестский	$21,6 \pm 1,2$	$28,4 \pm 2,8$	**	$23,8 \pm 1,2$	$30,9 \pm 2,8$	**
Надежда	$3,1 \pm 1,2$	$3,2 \pm 0,4$	-	$3,1 \pm 1,2$	$3,3 \pm 0,4$	-
Владлен	$8,7 \pm 2,3$	$13,2 \pm 1,7$	**	$10,9 \pm 2,3$	$23,8 \pm 1,7$	***
Ашадны	$4,2 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,5$	-	$4,3 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,5$	-

Примечание: 1) НИ – неинфицированные растения; И – инфицированные растения; 2) «Р (НИ – И)» – результаты проверки гипотезы о равенстве межгрупповых средних у сортов между неинфицированными и инфицированными растениями посредством оценки значения параметрического F-критерия Фишера и непараметрических критериев Ван дер Вардена, Краскала-Валлиса; 3) *, **, *** – $P < 0,05, 0,01, 0,001$ – соответственно.

Однако, как и в фазу всходов, активность лектинов контрольных и опытных растений в фазу первых настоящих листьев в пределах сорта различалась. Лектины инфицированных растений обладают более высокой комплексообразующей активностью по сравнению с лектинами, которые были экстрагированы из контрольных растений. Но есть и исключения. Например, у таких сортов, как Надежда и Ашадны комплексообразующая активность инфицированных растений по сравнению с контролем осталась практически без изменений.

Возрастание комплексообразующей активности лектинов у контрольных растений на стадии бутонизации (таблица 2) по сравнению с предыдущими фазами роста 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.

Анализируя полученные данные, сопоставляя их с имеющимся литературными источниками, можно предположить, что лектины в этих фазах роста растения принимают активное участие в формировании фундаментальных физиологических процессов. Показано, что в составе веществ флэзмы люпина узколистного присутствует самостоятельная группа PP2 флэзных лектинов [11]. Таким образом, увеличение комплексообразующей активности лектинов и их способности взаимодействовать с карбигидратами в процессе роста растения можно объяснить тем, что с увеличением размера растения увеличивается длина его проводящей системы и, соответственно, потребность растений в PP2 лектинах возрастает.

Важным является то, что зависимость между активностью лектинов и устойчивостью сорта к заболеванию антракнозом наблюдается как в случае опытных растений, так и в случае контрольных (неинфицированных) растений люпина узколистного. Сходная зависимость между активностью лектиновых белков и устойчивостью различных сортов люпина к заболеванию антракнозом у инфицированных и неинфицированных растений свидетельствует о том, что инфицирование растений люпина грибом *Colletotrichum gloeosporioides* лишь способствует увеличению комплексообразующей активности лектинов при сохранении общей картины устойчивости. Т.е. вне зависимости от того, инфицировано растение или нет, устойчивость определенного сорта люпина зависит от комплексообразующей активности его лектинов.

Отмечено, что комплексообразующая активность лектинов устойчивых к антракнозу сортов люпина узколистного для неинфицированных растений находится в пределах от 11,2 до 24,8 ЕА/ 50 мкл; а для инфицированных - от 13,7 до 39,9 ЕА/ 50 мкл. Сорта люпина узколистного, обладающие высокой устойчивостью к антракнозу, имели комплексообразующую активность лектинов семян в пределах от 69,2 до 132,7 ЕА/ 50 мкл для неинфицированных и 149 до 212,9 ЕА/ 50 мкл – для инфицированных растений.

Заключение. 1. Определение комплексообразующей активности лектиновых белков растений люпина узколистного, подвергнутых инфицированию грибом *Colletotrichum gloeosporioides*, показало, что инфицированные растения имеют более высокий уровень активности лектиновых белков по сравнению с активностью лектинов неинфицированных растений. При этом более высокая активность лектинов у инфицированных растений наблюдалась уже на стадии всходов. 2. Инфицирование растений люпина узколистного патогенным грибом *Colletotrichum gloeosporioides*, вызывающим антракноз люпина, способствует тому, что в ответ на воздействие патогена происходит заметное увеличение активности лектиновых белков. Активность лектиновых белков люпина узколистного имеет ярко выраженную сортоспецифичность. Кроме того, в зависимости от фаз роста растений, лектиновая активность заметно различается. 3. Устойчивость растений люпина узколистного к антракнозу находится в зависимости от комплексообразующей активности в них содержащихся лектиновых белков. Чем выше лектиновая активность, тем более устойчивым является сорт.

Литература. 1. Валуева, Т. А. Белки-ингибиторы протеолитических ферментов / Т. А. Валуева, В. В. Мосолов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31, № 6. – С. 579–589. 2. Игнатов, В. В. Углеводоузнающие белки – лектины / В. В. Игнатов // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 2. – С. 14–20. 3. Ковалёнок, Ю. К. Взаимодействие фитолектинов с мембранами энтероцитов тощей кишки как этиологический фактор гипомикроэлементозов / Ю. К. Ковалёнок // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. / Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – Горки : БГСХА, 2013. – Вып. 16, ч. 2. — С. 348–354. 4. Ковалёнок, Ю. К. Влияние фитолектинов на усвояемость микроэлементов в условиях *in vivo* / Ю. К. Ковалёнок // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2013. – № 3. – С. 38–41. 5. Ковалёнок, Ю. К. Лектины – фактор, способствующий микроэлементозам животных и повышающий устойчивость растений к болезням / Ю. К. Ковалёнок // Современные проблемы ветеринарии и животноводства : сборник статей по материалам III Международной научно-практической конференции, 8-9 октября 2015 г. – Краснодар : КубГАУ, 2015. – С. 74–81. 6. Ковалёнок, Ю. К. Фитолектины как этиологический фактор микроэлементозов у крупного рогатого скота / Ю. К. Ковалёнок // Аграрна наука – виробництво : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, м. Біла Церква (6 листопада 2014 року). – Біла Церква : БНАУ, 2014. – С. 15–16. 7. Фитолектины. Руководство по клинической фитотерапии / В. Ф. Корсун [и др.] – М. : Практическая Медицина, 2007. – 168 с. 8. Лектины / М. Д. Луцк [и др.] – Львов : Вища Школа, 1981. – 156 с. 9. Мосолов, В. В. Ингибиторы протеиназ из растений как полифункциональные белки / В. В. Мосолов, Л. И. Григорьева, Т. А. Валуева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 6. – С. 643–650. 10. Мосолов, В. В. Ингибитор химотрипсина и сериновых протеиназ микроорганизмов, выделенный из семян кукурузы / В. В. Мосолов, Е. В. Соколова, О. А. Ливенская // Биохимия. – 1984. – Т. 49, № 8. – С. 1334–1342. 11. Richardson, M. // *Phytochemistry*. – 1977. – Vol. 16, № 1. – P. 159–169.

Статья передана в печать 18.09.2018 г.