

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЛЕКТИНОВ И ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *PSEUDOCERCOSPORELLA HERPOTRICHOIDES* (FRON) DEIGHTON

В.Н. БЕЛАВА¹; С.Б. ЗЕЛЁНЫЙ²; О.А. ПАНИЮТА¹, кандидат биологических наук;
Н.Ю. ТАРАН¹, доктор биологических наук;
П.В. ПОГРЕБНОЙ², доктор биологических наук

¹Киевский национальный университет им. Т. Шевченко

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

Введение

Одной из исследуемых функций лектинов в растительном организме, которая базируется на способности распознавать малейшие отличия структуры углеводов и специфичности к мономеру и олигомерам хитина, является защита от фитопатогенов. Гипотезы о возможности участия лектинов в защите растений от патогенных микроорганизмов подкреплены данными о способности лектинов специфически взаимодействовать с поверхностью бактериальных клеток, спор и гиф грибов [6, 11, 12]. Исследования лектиновой активности (ЛА) при инфицировании растений на разных этапах онтогенеза показали её значительное возрастание по сравнению с контролем [4, 8, 9]. Эти данные свидетельствуют об участии лектинов в формировании стрессового состояния или неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы [3]. Изменения ЛА могут быть обусловлены, с одной стороны, конформационными перестройками белковых молекул, в ходе которых изменяется достижимость углеводсвязывающих центров, а с другой, – увеличением содержания этого белка, что, в свою очередь, может обеспечиваться на уровне транскрипции и/или трансляции. По данным литературы, при прорастании семян на ранних стадиях развития проростка синтезируется значительное количество лектинов [5]. Кроме того, с использованием ингибитора транскрипции мРНК было доказано существование в зародышах пшеницы пула запасных форм лектиновых мРНК [13], что обеспечивает быстрое возрастание ЛА за счет синтеза белка *de novo*. Логично предположить, что еще до начала возможного инфицирования включается механизм преадаптации растений на уровне транскрипции. Таким образом, целью нашей работы было определение уровня ЛА и лектиновой мРНК на ранних стадиях развития проростка при инфицировании и определить степень зависимости между этими показателями у различных по устойчивости сортов.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), восприимчивого к церкоспореллёзу сорта Мироновская 808 (украинской селекции), и относительно резистентного сорта Roazon (французской селекции).

В качестве фитопатогенного стрессора использовали гриб-возбудитель церкоспореллёза – *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton (высоковирулентный штамм 543 7/1, любезно предоставленный лабораторией иммунитета сельскохозяйственных растений к болезням Института защиты растений УААН).

Инфицирование семян проводили на стадии их прорастания суспензией конидий, исходный титр $5-7 \times 10^4$ КОЕ/см³ [1]. Начальный уровень ЛА и транскриптов определяли через 24 часа с момента первого увлажнения исследуемых семян – в момент инокуляции конидиальной суспензией. Последующие пробы отбирали каждые 1,5 часа (на протяжении 6 часов).

ЛА определяли методом ратусэритроагглютинации [7]. Содержание белка в выделенных экстрактах определяли по Бредфорд [10].

Экспрессию гена лектина (TaGLLc) определяли методом RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) [14]. Результаты обработаны статистически.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было установлено [2], что при инфицировании возбудителем церкоспореллёза ЛА в проростках озимой пшеницы в течение первых пяти суток патогенеза

менялась незначительно, но у резистентных сортов ЛА была на 20-50% выше, чем у восприимчивых. Все эти данные безусловно указывают на непосредственное участие лектинов в формировании защитных реакций растений против фитопатогенов. Но при выяснении роли лектинов, как первичных веществ, отвечающих за процесс узнавания чужеродного хитинсодержащего агента, его связывание, предотвращение проникновения или замедление процесса инфицирования, необходимо было провести исследования и на более ранних этапах развития болезни – с момента инфицирования.

В контрольных проростках исследуемых сортов в течение эксперимента нами зафиксировано снижение ЛА (рис. 1, рис. 2). Это согласуется с данными Triplett и Quatrano [15] о постепенной эвакуации лектинов зародыша во внешнюю среду, на основании которых авторы предположили, что лектин участвует в формировании защитной микросреды вокруг прорастающих семян и проростков от фитопатогенов.

Исследование экспрессии гена лектина в здоровых проростках восприимчивого сорта показало постепенное накопление мРНК в течение шести часов (рис. 1). Учитывая, что за тот же период отмечено снижение ЛА, эти данные подтверждают вывод Reumans с соавт. [13] о наличии в зародышах пшеницы пула запасных форм лектиновых мРНК. Более того, можно сказать, что на протяжении исследуемого времени в тканях проростков восприимчивого сорта продолжалось накопление запасных форм мРНК лектина.

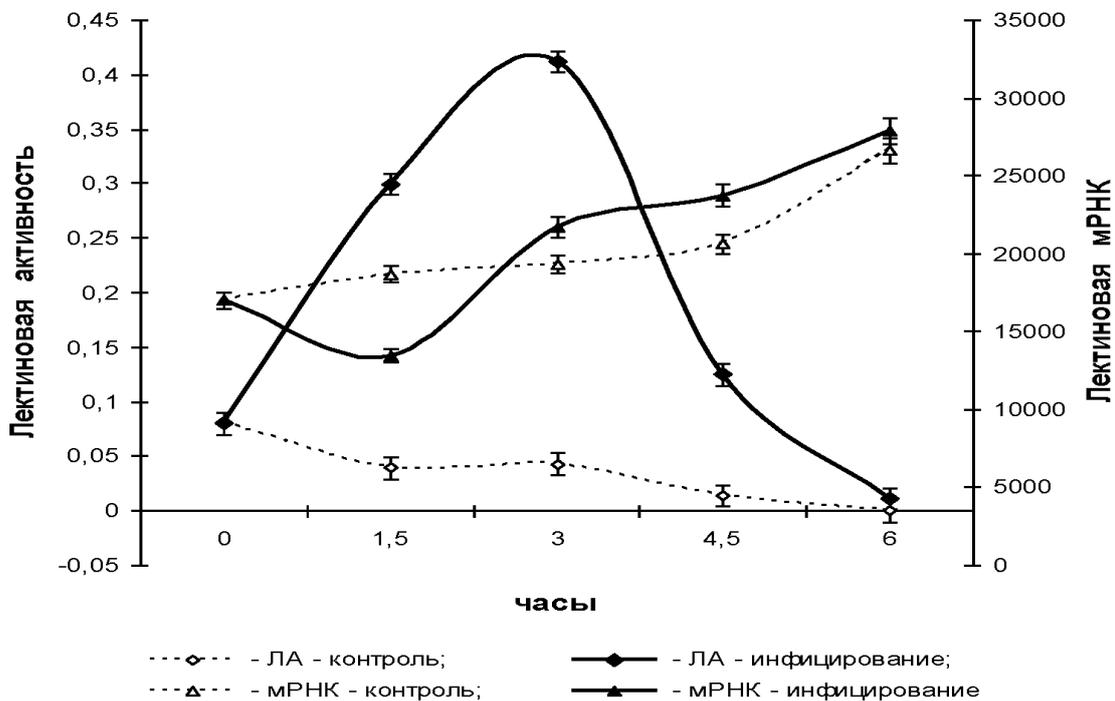


Рис. 1. Динамика лектиновых показателей в проростках оз. пшеницы восприимчивого сорта

**Мироновская 808 при инфицировании
*P. herpotrichoides***

В инфицированных проростках восприимчивого сорта (рис. 1) зафиксировали постепенное возрастание ЛА до третьего часа опыта: в 5,3 раза по отношению к начальному уровню и в 9,9 раз по отношению к контролю в момент регистрации. После чего отмечено постепенное снижение ЛА к 6 часу эксперимента до контрольного значения.

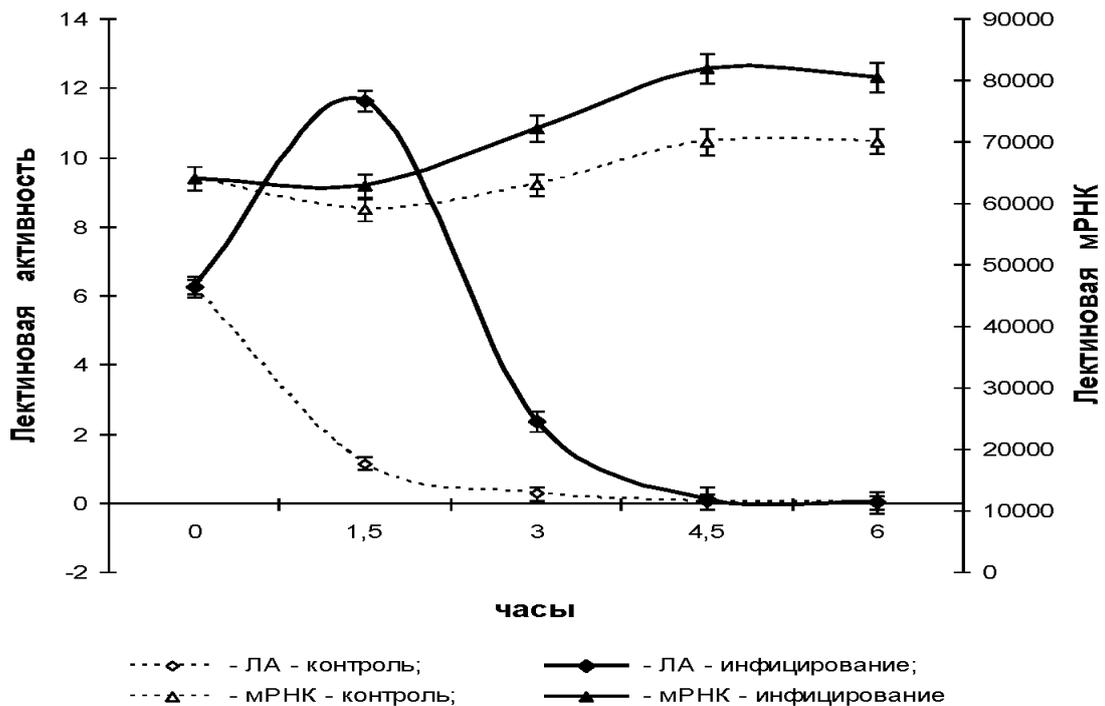


Рис. 2. Динамика лектиновых показателей в проростках резистентного сорта Roazon при инфицировании *P. herpotrichoides*

Исследование экспрессии гена лектина в инфицированных проростках восприимчивого сорта выявило резкое снижение (на 21% по отношению к начальному значению и на 28% по отношению к контролю) количества транскриптов. Вероятно, ингибирование грибными супрессорами новообразования защитных соединений (в нашем случае – лектинов) в растительной клетке происходит не только на уровне биосинтеза молекул, но и на уровне транскрипции. Кроме того, сокращение количества уже синтезированных запасных лектиновых мРНК в пределах пула, возможно, также происходит под действием супрессоров гриба. Накопление мРНК в последующие три часа (даже на 10-15% выше, чем в контроле), по нашему мнению, объясняется запуском других сигнальных систем, активирующих защитные механизмы. Учитывая, что за этот же период (после максимума ЛА на 3-й час эксперимента) зафиксировано постепенное снижение активности этого защитного белка, такая активация накопления мРНК лектина все же не может рассматриваться как переход растения на новый уровень адаптации, поскольку к 6 часу эксперимента количество мРНК в инфицированных проростках и в контроле становится одинаковым.

Для резистентного сорта Roazon исследование динамики количества лектиновой мРНК в неинфицированных проростках показало незначительное колебание (в пределах 9%) этого показателя с тенденцией к росту (рис. 2), при этом начальный уровень ЛА в проростках резистентного сорта был в 8 раз выше, чем у восприимчивого. Учитывая, что в то же время отмечено снижение ЛА, можно считать, что в тканях здоровых проростков резистентного сорта за сутки прорастания пул запасных форм лектиновых мРНК полностью сформировался.

В инфицированных проростках резистентного сорта возрастание ЛА происходит динамичнее, чем в проростках восприимчивого, и раньше на 1,5 часа (в 2 раза по отношению к начальному уровню и в 10 раз по отношению к контролю в фиксируемый момент). Последующее резкое падение ЛА уже к 4,5 часу уравнивает значение этого показателя с контрольным (в рамках погрешности). Возрастание ЛА при инфицировании может происходить в результате разрушения в процессе патогенеза клеточных стенок и высвобождения из них лектинов. Но такое резкое возрастание ЛА объясняется активацией механизма синтеза этих защитных белков, а скорость, с которой инициируется синтез, – наличием запасных лектиновых мРНК в зародышах пшеницы. Разница абсолютных значений

ЛА для сортов с разной устойчивостью объясняется разницей количества мРНК. Считаем, что именно способность растений мгновенно активизировать защитные реакции, а в данном эксперименте – повышать ЛА, определяет степень торможения проникновения патогена в клетки, а, следовательно, и уровень устойчивости сорта.

Исследование экспрессии гена лектина в проростках резистентного сорта под действием инфицирования выявило постепенное возрастание количества мРНК (с 15%-ным превышением контрольных значений – к шестому часу), с незначительной задержкой на отметке 1,5 ч, что можно назвать слабым супрессорным эффектом. Разрушения уже сформированных мРНК при патогенезе не выявлено. Таким образом, в ответ на действие патогена происходит экспрессия гена лектина, накопление мРНК защитных соединений, повышается уровень адаптивных механизмов растительного организма, что, в свою очередь, способствует преадаптации к новым возможным воздействиям фитопатогенов и повышению неспецифической устойчивости.

Выводы

В результате проведенных исследований определили, что еще до начала возможного инфицирования в здоровых проростках пшеницы происходят реакции механизма преадаптации на уровне транскрипции. При прорастании семян в проростках формируется пул запасных форм лектиновых мРНК, что за счет синтеза белка *de novo* обеспечивает быстрое возрастание ЛА в случае атаки патогенов. При этом количество запасных мРНК лектина в проростках резистентного сорта значительно превышает этот показатель для проростков восприимчивого сорта. Таким образом, степень устойчивости сорта определяется скоростью запуска защитных реакций (в наших экспериментах – синтеза лектинов), а сила реакции (в наших экспериментах – ЛА) – количеством запасных мРНК.

Список литературы

1. Белава В.Н., Панюта О.О., Таран Н.Ю. Модельна система інфікування та оцінки рівня стійкості озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) до збудника церкоспорельозу (*Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton) // Карантин і захист рослин. – 2008. – № 7. – С. 25-28.
2. Белава В.Н., Панюта О.О., Таран Н.Ю. Лектинова активність проростків пшениці при інфікуванні *P. herpotrichoides* за дії перексиду водню // Вісник аграрної науки. – 2008. – № 8. – С. 26-29.
3. Браун А.Н., Моженко Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. – 230 с.
4. Кашулин П.А., Любимова Н.В., Мерзляк М.Н. Структурные изменения свободного и мембранносвязанного лектина картофеля под влиянием олигомеров К-ацетил^α-глюкозамина // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28, № 2. – С. 280-291.
5. Лепехин Е.А., Яловой А.И., Рыбак В.И. Активность и углеводная специфичность лектинов в прорастающих семенах кукурузы // Физиология растений. – 1986. – Т. 33, № 2. – С. 390-394.
6. Линевич Л.И. Лектины // Успехи биологической химии. – 1979. – Т. 20. – С. 71-94.
7. Погоріла Н.Ф., Суржик Л.М., Погоріла З.О. Новий спосіб тестування лектинів рослин // Укр. ботан. журнал. – 2002. – Т. 59, № 2. – С. 217-220.
8. Изменение лектиновой активности проростков пшеницы при инфицировании микоплазмами / Трифонова Т.В., Максютова Н.Н., Тимофеева О.А., Чернов В.М. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 6. – С. 675-679.
9. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
11. Callow J.A. Recognition, resistance, and role of plant lectins in host-parasite interactions // Advances in Botanical Research. – 1977. – V. 4. – P. 1-7.
12. Etzler M.E. Are lectins involved in plant-fungus interactions? // Phytopathology. – 1981. –

V. 71, № 7. – P. 744-746.

13. Peumans N.J., Stinissen H.M., Carlier A.R. Lectin synthesis in developing, and germinating wheat and rye embryos // Biochem. J. – 1982. – V. 156. – P. 41-44.

14. Toribio F. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes // J. Chromatography. – 1996. – V. 684. – P. 77-97.

15. Triplett D.S., Quatrano R.S. Timing, localization, and control of wheat germ agglutinin synthesis in developing wheat embryos // Develop. Biol. – 1982. – V. 91, № 2. – P. 491-496.

Рекомендовано к печати к.б.н. Палий А.Е.