

## АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ ЛЕКТИНОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБНЫМИ ПАТОГЕНАМИ

©2013 Г.Х. Шаймуллина, Р.Р. Хусаинова, Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань

Поступила 14.06.2013

Исследована гемагглютинирующая активность и молекулярный состав лектинов из клеток корней проростков озимой пшеницы сорта Мироновская 808 и Казанская 560, инфицированных возбудителями грибных заболеваний. Методами очистки и фракционирования белков выявлено увеличение количества белков клеточной стенки с агглютинирующей активностью у двух сортов озимой пшеницы, что свидетельствует об участии этих белков в механизмах защитного действия при патогенезе. Показано, что увеличение лектиновой активности является одной из защитных реакций растительного организма на действие патогенов и зависит от устойчивости сорта и воздействующего инфекционного агента.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., лектины, очистка, патоген.

Проблема инфекционных болезней растений пшеницы, приводящая к потерям урожая и ограничению объемов производства сельскохозяйственных культур, не нова, но в последнее время приобрела глобальный характер. Поэтому важное значение приобретает изучение молекулярных основ устойчивости растений к фитозаболеваниям, в частности, к грибным патогенам [1].

При инфицировании растений фитопатогенами лектинам отводят роль первичных агентов в узнавании участков сложных углеводов на поверхности клеток патогенов и дальнейшем развитии реакций сверхчувствительности. Гипотезы об участии лектинов в защите растений от болезнетворных агентов подкреплены данными о способности этих белков специфически взаимодействовать с поверхностью бактериальных клеток, спор и гиф грибов [2], что приводит к несовместимому или совместимому взаимодействию организмов, которое соответственно проявляется в индукции или в отсутствии защитной реакции растений на атаку патогена [3].

Одним из признаков активной реакции растений на инфицирование является количественное изменение содержания или активности лектиновых белков. В связи с этим, цель данной работы состояла в анализе уровня активности и молекулярного состава лектинов при формировании иммунного ответа разных сортов озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), инфицированных фитопатогенами *Fusarium (F.) oxysporum* Schlechtend.:Fr., *Cladosporium (C.) graminum* Cda., *Alternaria spp.* и *Aspergillus (A.) niger*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Мироновская 808 и Казанская 560. Семена перед

посевом стерилизовали в 96% этаноле и промывали стерильной дистиллированной водой. Далее семена опытного варианта замачивали на сутки в суспензии конидий с исходным титром (1-3)\*10<sup>4</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> (КОЕ - колониеобразующие единицы). Инфицирование проводили двумя специфическими для пшеницы фитопатогенными грибами *Fusarium (F.) oxysporum* Schlechtend.:Fr. и *Cladosporium (C.) graminum* Cda. и двумя неспецифическими – *Alternaria spp.* и *Aspergillus (A.) niger*. Растения выращивали в лабораторных условиях в кюветах на водопроводной воде при освещенности 100 Вт/м<sup>2</sup> и 12-часовом фотопериоде в течение 7 сут.

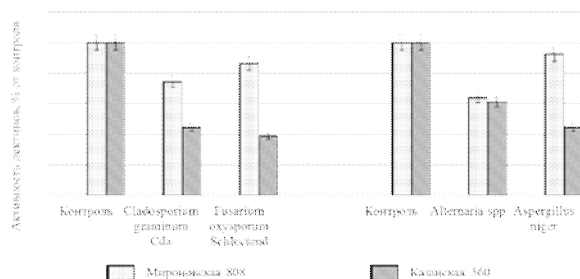
Растворимые лектины экстрагировали 0,05н HCl, лектины клеточной стенки – 0,05% раствором тритона X-100 по методу, описанному в ранее опубликованной работе [4]. Для определения количества белка использовали метод Bradford [5]. Активность лектинов определяли в планшетах для иммунологических исследований по их способности агглютинировать трипсинизированные эритроциты 1 группы крови. Лектиновую активность рассчитывали по минимальному количеству белка, вызывающему агглютинацию эритроцитов (мкг белка/мл)-1. Эритроциты получали и трипсинизировали по методу Луцика [6]. Гель-фильтрацию проводили на колонке с Sephadex G-150, которая позволила отделить лектины от значительного количества низкомолекулярных примесей непротеиновой природы. Результаты обработали статистически, их считали достоверными при уровне погрешности ≤5% по критерию Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во время прорастания семян на ранних этапах развития проростка синтезируется значительное количество лектинов [7], также как это происходит в ходе нормального онтогенеза растений. В наших экспериментах при инфицировании фитопатогены уменьшали активность растворимых лектинов у двух сортов озимой пшеницы (рис. 1). Вероятно, ингибирующее действие фитопатогенов на актив-

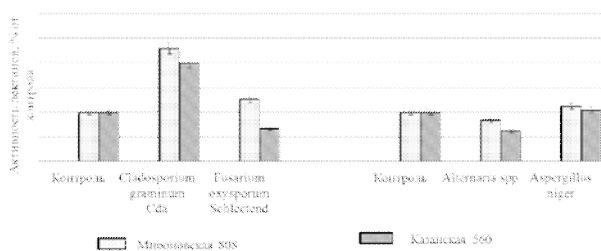
Шаймуллина Гульназ Хидиятовна, аспирант, e-mail: gulnazhajmullina@yandex.ru; Хусаинова Раиля Рафаиловна, студент, e-mail: gulnazhajmullina@yandex.ru; Невмержицкая Юлия Юрьевна, к.б.н., доцент, e-mail: nuu76@mail.ru; Тимофеева Ольга Арнольдовна, д.б.н., зав. кафедрой, e-mail: olga.timofeeva@kpfu.ru

ность растворимых лектинов может быть обусловлено взаимодействием углеводсвязывающих центров этих белков с инфекционными структурами патогенов, в результате которого лектины не могут участвовать в агглютинации эритроцитов. При этом чувствительность активности растворимых лектинов к патогенам была меньше у Мироновской 808. Возможно, у Казанской 560 происходит более эффективная инактивация фитопатогенов за счет усиления взаимодействия лектиновых белков с углеводными гаптенами грибов.



**Рис. 1.** Активность растворимых лектинов озимой пшеницы сорта Мироновская 808 и Казанская 560 при инфицировании патогенными грибами

В литературе накоплено достаточное количество сведений, подтверждающих, что накопление лектинов тесно связано с индукцией устойчивого состояния растения-хозяина [8]. В наших опытах заражение растений специфическим фитопатогеном *Cladosporium graminum* Cda. приводило к значительному повышению активности лектинов клеточной стенки у растений двух сортов (рис. 2). При этом ответная реакция растений на *Cladosporium graminum* Cda. была выражена сильнее по сравнению с *Fusarium spp.* *Fusarium spp.* усиливал активность лектинов клеточной стенки только у сорта Мироновская 808. По-видимому, этот сорт более восприимчив к *Fusarium spp.* по сравнению с Казанской 560. Следует отметить, что и степень поражения этим патогеном растений Мироновской 808 была выше по сравнению с Казанской 560. При действии неспецифического возбудителя *Alternaria spp.* активность лектинов клеточной стенки снижалась, а *Aspergillus niger* не оказывал влияния на активность лектинов у двух сортов (рис. 2).



**Рис. 2.** Активность связанных с клеточной стенкой лектинов озимой пшеницы сорта Мироновская 808 и Казанская 560 при инфицировании патогенными грибами

В следующей части работы с помощью гель-

фильтрации мы провели хроматографическое разделение белков клеточной стенки корней проростков озимой пшеницы сортов Мироновская 808 и Казанская 560, инфицированных патогенными грибами.

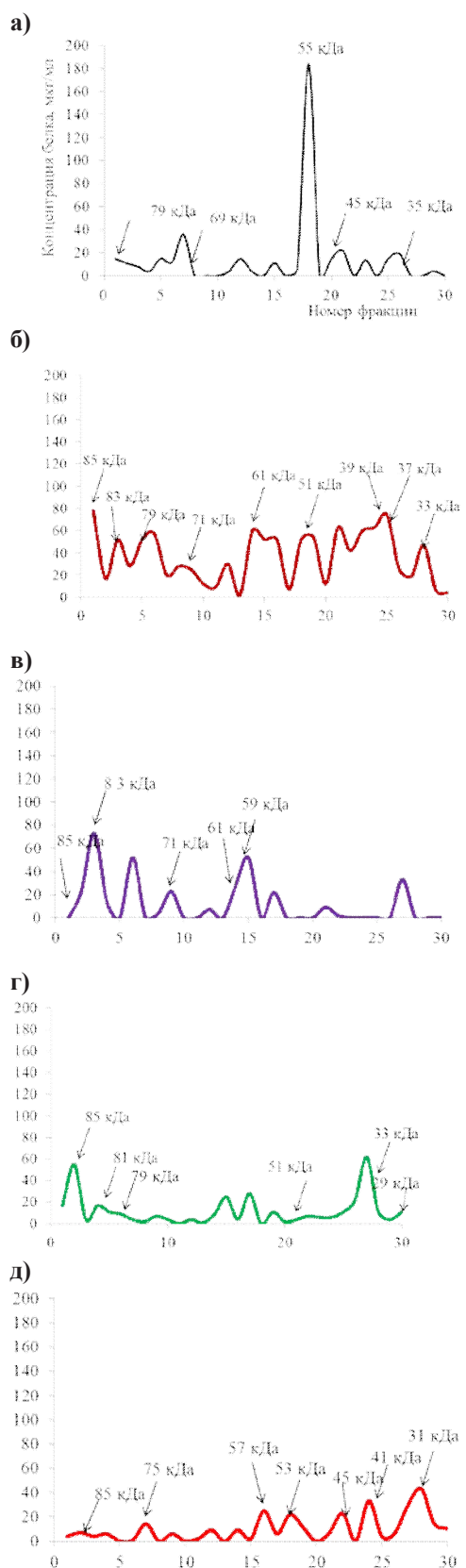
У растений Мироновской 808 в контрольном варианте среди полученных белковых фракций лектиновая активность обнаруживалась во фракциях, содержащих белки с молекулярной массой 79, 69, 55, 45, 35 кДа (рис. 3). На основании работы Chivasa et al. [9], которые проанализировали белки клеточной стенки *Arabidopsis thaliana*, можно сделать некоторые предположения относительно обнаруженных нами лектинов клеточной стенки, поскольку белки арабидопсиса имеют состав, близкий к составу белков, которые характерны для других растений. Белок с молекулярной массой 35 кДа может быть классическим лектином пшеницы – агглютинином зародыша пшеницы (АЗП), резкое накопление которого происходит при разных неблагоприятных условиях, относится к экскретируемому белкам, выделение которого в наружную среду может иметь значение для предохранения ослабленных растений от почвенной инфекции [8]. Обнаруженные нами белки наряду с лектиновой активностью, могут обладать ферментативной активностью. Например, белки с молекулярной массой 79 кДа и 45 кДа могут быть ГТФ-связывающими [9].

Патогенные микроорганизмы по-разному влияли на профиль элюции белков Мироновской 808 (рис. 3). Инфицирование неспецифическими грибами рода *Alternaria* приводило к исчезновению белков с молекулярной массой 79, 69 кДа и 45 кДа. При этом в профиле элюции появились белки 85, 83, 71, 61, 59 кДа. В варианте с грибом *Aspergillus niger* не было только белков 69 кДа и 55 кДа, характерных для контрольных растений, при этом лектиновая активность обнаруживалась во фракциях 85, 83, 71, 61 кДа (эти же белки появлялись при действии *Alternaria spp.*), а также белки 79, 51, 47, 38, 37, 33 кДа и 29 кДа.

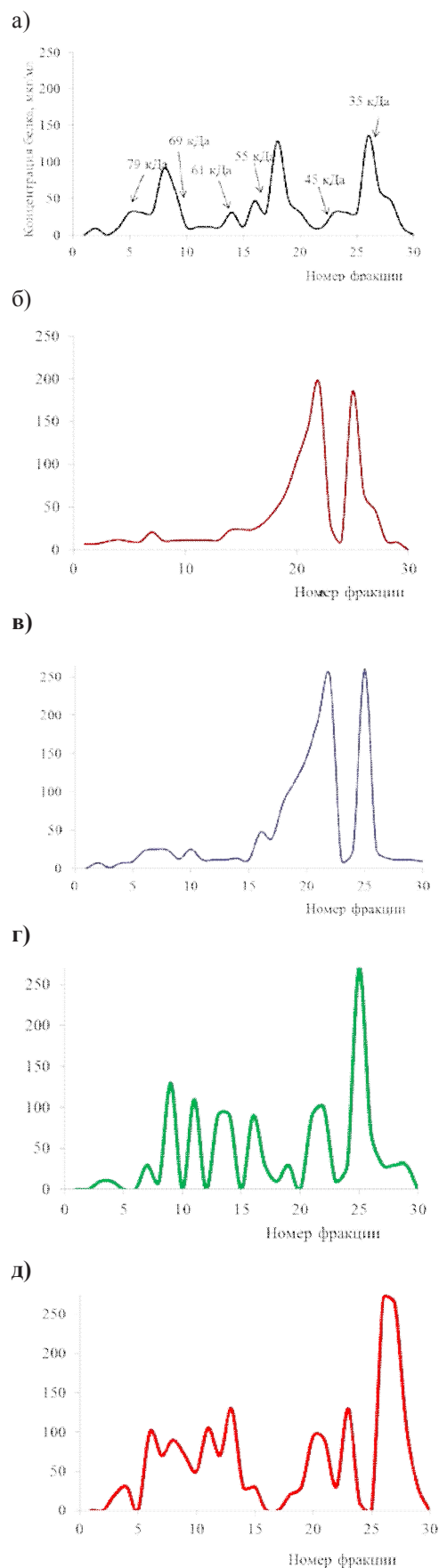
Кроме белков, выявленных у контрольных растений, в варианте с заражением *Cladosporium graminum* Cda. появились новые белки: 85, 81, 79, 51, 33 кДа и 29 кДа, а при действии *Fusarium spp.* мы обнаружили белки с молекулярной массой 87, 85, 75, 57, 55, 53, 45, 41, 35, 31 кДа (рис. 3).

В профиле элюции белков клеточной стенки контрольных растений сорта Казанская 560 лектиновая активность была обнаружена во фракциях белков с молекулярной массой 79, 69, 61, 55, 45, 35 кДа. Заражение семян сорта Казанская 560 как специфическими, так и неспецифическими грибами вызывало изменение всего профиля элюции белков клеточной стенки (рис. 4).

В варианте с авирулентными микроорганизмами *Alternaria spp.* и *Aspergillus niger* значительно снизилось содержание высокомолекулярных белков, но возросла концентрация среднемолекулярных



**Рис. 3.** Профиль элюции при гель-хроматографии белков клеточной стенки проростков озимой пшеницы Мироновская 808: а) контрольные растения, б) *Aspergillus niger*, в) *Alternaria spp.*, г) *Cladosporium graminum* Cda., д) *Fusarium spp.*



**Рис. 4.** Профиль элюции при гель-хроматографии белков клеточной стенки проростков озимой пшеницы Казанская 560: а) контрольные растения, б) *Aspergillus niger*, в) *Alternaria spp.*, г) *Cladosporium graminum* Cda., д) *Fusarium spp.*

полипептидов, которые формировали два характерных пика. При этом во всех выявленных фракциях наблюдалась лектиновая активность. Можно предположить, что индукция образования среднемолекулярных белков, обладающих лектиновой активностью, необходима для эффективного взаимодействия с авирулентными грибными патогенами.

Таким образом, обнаружено, что неспецифические микроорганизмы *Alternaria spp.* и *Aspergillus niger* вызывают у растений сорта Казанская 560 увеличение содержания среднемолекулярных лектиновых белков клеточной стенки, а специфические фитопатогены *Cladosporium graminum* Cda. и *Fusarium spp.* – высокомолекулярных лектиновых белков. По-видимому, эти две группы белков участвуют в узнавании и инактивации патогенов: среднемолекулярные взаимодействуют с авирулентными возбудителями, высокомолекулярные – с вирулентными.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молодченкова О.О., Адамовская В.Г., Досенко В.Е., Тихонов П.С. Лектиновая активность и экспрессия генов лектина проростков пшеницы при инфицировании грибными патогенами и действии салициловой кислоты // Вісник Харківс. Нац. Агр. Ун-ту. Серія Біологія. 2012. Т. 26. Вип. 2. С. 54-60.
2. Etzler M.E. Are lectins involved in plant-fungus interactions? // Phytopathology. 1981. V. 71. N 7. P. 744-746.
3. Белава В.Н., Зеленый С.Б., Панюта О.А., Таран Н.Ю., Погребной П.В. Экспрессия генов лектинов и дефенсина у сортов пшеницы Мироновская 808 и Roazon при инфицировании *Pseudocercospora herpotrichoides* // Biopolymers and Cell. 2010. V. 26. N. 1. P. 45-50.
4. Тимофеева О.А., Невмерзжская Ю.Ю., Московкина М.А. Активность и состав лектинов клеточной стенки пшеницы при действии низких температур и ингибиторов кальциевой сигнальной системы // Физиол. раст. 2010. Т. 57. № 2. С. 209-216.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.
6. Луцук М.Д., Панасюк Е.Н., Луцук А.Д. Лектины. Львов: Вища шк. Изд-во при Львов. ун-те, 1981. 156 с.
7. Lepekhn E.A., Yalovoi A.I., Rybak V.I. Activity and specificity carbohydrates in lectins of germinating maize grains // Russ. J. Plant Physiol. 1986. V. 33. N 2. P. 390-394.
8. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 159 с.
9. Chivasa S., Ndimba B. K., Simon W. Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall // Electrophoresis. 2002. V. 23. P. 1754-1765.

#### LECTIN ACTIVITY AND COMPOSITION IN THE WHEAT CELL WALLS DURING INFECTION FUNGAL PATHOGENS

©2013 G.H. Shaymullina, R.R. Khusainova, Y.Y. Nevmerzhitskaya, O.A. Timofeeva

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

Hemagglutinating activity and the molecular composition of the lectin wheat germ cells Mironovskaya 808 and Kazankaya 560 infected with pathogens of fungal diseases are investigated. The methods of purification and fractionation of proteins revealed an increase in the number of cell wall proteins with agglutinating activity in two varieties of winter wheat, which indicates the involvement of these proteins in the mechanisms of the protective effect of the pathogenesis. It is shown that an increase in activity of the lectin is one of the protective reaction of the organism to the action of plant pathogens and stability depend on the variety and exposure to infectious agent.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., lectins, purification, pathogen.

Gulnaz Shaymullina, postgraduate student, e-mail: gulnazshajmullina@yandex.ru; Railya Khusainova, student, e-mail: gulnazshajmullina@yandex.ru; Yulia Nevmerzhitskaya, Candidate of Biology, associate professor, e-mail: nuu76@mail.ru; Olga Timofeeva, Doctor of Biology, head of department, e-mail: olga.timofeeva@kpfu.ru