

УДК 581.1

## **ВУГЛЕВОДНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА АКТИВНІСТЬ ЛЕКТИНІВ КЛІТИННИХ СТІНОК ЦИБУЛИН ЧАСНИКУ (*ALLIUM SATIVUM L.*) КУЛЬТУРНОГО СОРТУ І ДИКОГО ВИДУ, ЩО РІЗНЯТЬСЯ ЗА СТІЙКІСТЮ ДО ФУЗАРІОЗУ**

**П.С.Тихонов**

*Одеський державний аграрний університет*

*Визначили вуглеводну специфічність і активність лектинів цибулин часнику (*Allium sativum L.*) культурного сорту і дикого виду, що різняться за стійкістю до фузаріозу. Припустили, що досліджувані параметри беруть участь у формуванні резистентності часнику до патогенів *Fusarium spp.**

**Ключові слова:** лектини; вуглеводна специфічність та активність, цибулини часнику, стійкість до фузаріозу.

**Вступ.** Грибкові захворювання сільськогосподарських рослин викликають великий інтерес у зв'язку з їх широким розповсюдженням. Уражаються патогенними грибами велика кількість видів рослин. Площі сільськогосподарських угідь, уражені грибковими захворюваннями, можуть бути досить великими. Мікотоксини, які продукуються грибами, можуть бути надзвичайно отруйними і представляти загрозу здоров'ю і навіть життю людини і сільськогосподарських тварин. У зв'язку з цим контроль за поширенням грибкових захворювань є досить актуальним завданням.

Одним з напрямків зусиль, які можуть знизити негативний вплив грибкових захворювань на якість їжі та кормів, і в той же час мінімізувати забруднення навколишнього середовища засобами захисту рослин, є виведення сортів і форм рослин, стійких до цих захворювань. Традиційні методи селекції дозволяють вирішувати подібні завдання. Однак всілякі витрати при цьому досить великі. Для мінімізації витрат на створення резистентних сортів і форм рослин можна використовувати кілька підходів. Перш за все це методи біотехнології рослин, які набули широкого поширення в багатьох країнах світу. Іншим підходом для вирішення зазначених завдань є використання стандартних біохімічних методів, що застосовуються на ранніх стадіях розвитку рослин, з метою відбору резистентних рослин, які в подальшому можуть бути використані як вихідний матеріал для селекції традиційними методами або із залученням методів біотехнології рослин.

Формування стійкості рослин до дії патогенних грибків, зокрема *Fusarium spp.*, пов'язане з активацією цілого комплексу захисних реакцій, які відповідальні за збереження та перебудову метаболізму рослин в умовах

патогенезу. Відзначено, що при інфікуванні грибними патогенами в рослини індукується синтез лектинів, багатьох ферментів, а також їх інгібіторів [1-7]. Інфекційний процес спричиняє накопичення фенольних сполук, утворення лігніну. Посилення синтезу вільних фенолів і процеси лігніфікації в більшості випадків корелюють зі зростанням активності ключового ферменту фенольного метаболізму - фенілаланінамміакліази. Показано, що цей фермент бере участь в утворенні попередників саліцилової кислоти, фітоалексинів і мономерів лігніну, що змінює структурно-функціональні характеристики рослинних клітин, активуючи таким чином їх захисні реакції. Встановлено також, що саліцилова кислота бере участь в патогенезі рослин.

Велику роль в розпізнаванні патогенних організмів і формуванні захисних механізмів рослин відводять лектинам. Лектини - це білки, які зворотно і специфічно зв'язують вуглеводні залишки різної хімічної природи [8]. Захисну роль цих білків розглядають у зв'язку з їх здатністю специфічно взаємодіяти з вуглеводними компонентами на поверхні клітин патогенів, що призводить до пригнічення їх росту. Крім того, вважають, що вони можуть бути ефекторами для включення сигнальних систем, що активують реакції стійкості рослин [9,10]. Однією з ознак залучення білків в реакцію стійкості / сприйнятливості є зміна їх вмісту в рослині і / або активності [11,12]. Встановлено, що рівні лектинової активності та вмісту мРНК лектинів у різних за стійкістю до патогенів сортів пшениці при інфікуванні *Fusarium graminearum*, *Alternaria* spp. і дії саліцилової кислоти розрізняються між собою [13].

Аналіз рівня вуглеводної специфічності і активності лектинів, а також вивчення особливостей експресії генів лектинів у видів і сортів рослин, що різняться за стійкістю до фітозахворювань при інфікуванні патогенами дозволить наблизитися до розуміння захисної ролі цих білків при патогенезі. Це в свою чергу дозволить розробити ефективні способи захисту рослин від фітозахворювань.

Виходячи з цього, метою даного дослідження було вивчення вуглеводної специфічності і активності лектинів цибулин часнику (*Allium sativum* L.) культурного сорту Український білий гуляйпільський і дикого виду, які розрізняються за стійкістю до фузаріозу.

**Методика досліджень.** Лектини виділяли як описано раніше [14,15]. Активність лектинів в препаратах визначали за реакцією прямої аглютинації еритроцитів [16]. За лектинову активність приймали величину, зворотну мінімальній концентрації, за якої відбувається аглютинація еритроцитів ( $\text{мкг білку/мл}$ )<sup>-1</sup>. Реакцію конкурентного інгібування лектинів проводили за Луциком та ін. [17] при початковій концентрації цукрів 500 мМ. Спорідненість лектинів до екзогенних цукрів визначали як найменшу концентрацію цукру, за якої аглютинація еритроцитів була відсутня. Вміст білка в екстрактах визначали за методом Лоурі.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Спорідненість лектинів зубків часнику культурного сорту до D-глюкози, D-фруктози, D-галактози і N-ацетилглюкозаміну була відсутня протягом усього періоду дослідження:

14 діб пророщування цибулин. Найбільшою була спорідненість до D-манози. Аналогічні результати були отримані і для дикого виду часнику з однією істотною відмінністю. У культурного часнику рівень спорідненості до D-манози залишався приблизно однаковим протягом 9 діб. Надалі на 10-ту добу знижувався в 1,5 рази, залишаючись на цьому рівні до 14-ти діб. У дикого виду спорідненість до D-манози постійно збільшувалася протягом 12-ти діб, а в подальшому залишалася на цьому рівні до 14-ти діб. Ці відмінності можуть свідчити про великі адаптаційні можливості дикого виду в порівнянні з культурним сортом. З огляду на те, що культурні сорти часнику втратили можливість утворювати насіння і розмножуються тільки вегетативним шляхом цибулинами і повітряними цибулинками [18], для відбору цінних ознак диких форм найбільш доцільним був би метод культури тканин *in vitro*.

Спорідненість до D-глюкозаміну, D-галактозаміну і D-фруктозо-6-фосфату була нижче в 4 рази в порівнянні з такою для D-манози. Рівень цієї спорідненості як і в випадку з D-манозою залишався без змін протягом 9 діб. Далі протягом 10-14 діб спостерігалось зменшення спорідненості в 2 рази. Ця закономірність відзначалася як у культурного сорту так і дикого виду.

У разі впливу 2 мМ саліцилової кислоти на 2-у добу пророщування спостерігалось різке підвищення спорідненості до D-манози. Для культурного сорту це підвищення становило 15 разів у порівнянні з першими добами експерименту, а для дикого виду - 40 разів.

Під впливом саліцилової кислоти спорідненість лектинів до D-глюкозаміну і D-галактозаміну не змінювалася протягом 9 діб. На десятю добу спорідненість знижувалася до 60% у порівнянні з контролем. Спорідненість до D-фруктозо-6-фосфату взагалі не змінювалася протягом 14 діб. Зазначені закономірності встановлені для культурного сорту і дикого виду.

Отримані дані свідчать за вплив саліцилової кислоти на індукцію активності лектинів, що мають спорідненість до D-манози, D-глюкозаміну і D-галактозаміну. В той же час вона взагалі не справляє ніякого впливу на лектини, що мають спорідненість до D-фруктозо-6-фосфату.

Зниження спорідненості лектинів до деяких цукрів може бути обумовлено пригніченням лектинової активності вуглеводами, що утворюються при гідролізі полісахаридних компонентів клітинних стінок цибулин часнику в умовах стресу. Не можна виключити можливості того, що саліцилова кислота впливає на вуглеводні детермінанти вже існуючих, а не синтезованих *de novo* лектинів.

Аналіз лектинової активності в цибулинах часнику культурного сорту і дикого виду показав, що максимальна активність лектинів спостерігалася в обох випадках на третю добу пророщування. Проте у дикого виду вона була в 5 разів вище, ніж у культурного сорту. Далі до 14-ти діб спостерігали поступове зниження активності лектинів до рівня, на якому вона перебувала на початку експерименту.

У рослин, які вирощувалися в присутності 2 мМ саліцилової кислоти, лектинова активність клітинних стінок різко збільшувалася на другу добу експерименту. Зазначена закономірність спостерігалася і для культурного сорту, і для дикого виду з тією різницею, що у останнього збільшення активності було в 8 разів більш інтенсивне, ніж у культурного сорту.

Наведені дані дозволяють припустити, що метаболіти, які утворюються при дії саліцилової кислоти, можуть бути сигнальними молекулами, що беруть участь в системі активації генів, які кодують ферменти, що необхідні для синтезу різних біологічно активних речовин, в тому числі лектинів.

**Висновки.** Виявлені відмінності у вуглеводній специфічності й активності лектинів культурного сорту часнику і дикого виду, що різняться за стійкістю до фузаріозу, дозволяють припустити, що досліджувані параметри беруть участь у формуванні резистентності часнику до патогенів *Fusarium spp.* Дикий вид був більш стійким до вказаних патогенів і в той же час він показував більш різкі зміни вуглеводної специфічності й активності лектинів в досліджуваних умовах у порівнянні з культурним сортом.

З огляду на те, що підвиди і форми часнику не є постійними і при зміні умов вирощування можуть перетворюватися з однієї форми в іншу [19-21], було б доцільним провести подібні дослідження в різних кліматичних зонах. Отримані дані дозволять зробити більш обґрунтовані висновки щодо ролі лектинів у формуванні резистентності часнику до фітозахворювань, зокрема до фузаріозу.

#### **Література.**

1. Адамовська В.Г., Тихонов П.С., Молодченкова О.О., Похиленко Л.Й., Левицький Ю.А. Зміна протеїназно-інгібіторної системи пшениці та ячменю при дії саліцилової кислоти // Онтогенез рослин в природному та трансформованому середовищі: Матеріали Міжнародної конференції (Львів, 1998). – Львів, 1998. – с.185.

2. Адамовська В.Г., Волчевська О.Є., Молодченкова О.О., Тихонов П.С. Участь саліцилової кислоти, лектинів та інгібітору трипсину в адаптації рослин при фітозахворюваннях // Стійкість культурних рослин до біотичних та абіотичних факторів: Матеріали Міжнародної конференції (Тернопіль, 1998). – Тернопіль, 1998. – с.127.

3. Molodchenkova O., Adamovskaya V., Ciselskaya L., Levitskiy Yu., Volchevska O., Tykhonov P. Protein-proteinase system features of cruciferous plants under stresses. // Durable resistance: key to sustainable agriculture. Proceedings of International simposium (Wageningen, The Netherlands: November 28-December 1, 2000). – Wageningen, 2000, p.148.

4. Адамовська В.Г., Цісельська Л.Й., Тихонова О.В., Молодченкова О.О., Тихонов П.С., Муранова А.С. Особливості впливу *Fusarium spp.* та лектину сої на активність інгібітору трипсину, фенілаланінаміакліази та лектинів в проростках злакових культур // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти.

Матеріали III Міжнародної конференції (Львів, 4-6 жовтня 2007). – Львів, 2007. – с.105.

5. Адамовська В.Г., Цісельська Л.Й., Захарова О.О., Молодченкова О.О., Тихонов П.С. Вплив лектину на розвиток грибів роду *Fusarium* та ростові процеси проростків злакових культур при ураженні фузаріозом // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей. Материалы Международной научно-практической конференции (Одесса, 11-14 сентября 2007). – Одесса, 2007. – с.39.

6. Molodchenkova O., Adamovskaya V., Ciselskaya L., Tykhonov P. Investment of biochemical adaptive responses in the formation of cereal crops resistance to biotic and abiotic factors of environment // Responses of plants to environmental stresses. Abstracts of conference Elena, 12-18 May, 2008. – Elena, Bulgaria. – p.65-66.

7. Адамовская В.Г., Цисельская Л.И., Тихонова О.В., Молодченкова О.О., Тихонов П.С. Метаболизм фенилаланинаммиаклиазы, ингибитора трипсина и эндогенных лектинов в растениях злаковых культур с разным уровнем устойчивости к фузариозу при действии экзогенного лектина // Физиология и биохимия культурных растений. – 2008. – т. 40, № 4. – с.318-328.

8. Бабоша А.В., Ладыгина М.Е. Физиолого-биохимические и биофизические методы диагностики степени устойчивости растений к патогенам и другим факторам. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992. – с.43-52.

9. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160с.

10. Кириченко О.В., Сергієчко В.Г. Фунгітоксична активність рослинних лектинів // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – т. 38, № 6. – с.526-534.

11. Комарова Э.Н., Выскребенцова Э.И., Трунова Т.И. Изменение лектиновой активности клеточных стенок этиолированных проростков озимой пшеницы в процессе закаливания к морозу // Доклады академии наук [Россия]. – 1993. – т. 329, № 5. – с.680-685.

12. Молодченкова О.О., Адамовская В.Г. Лектины и защитные реакции растений // Вісник Харківського національного аграрного університету, серія біологія, 2014, вип.1(31). – с.30-46.

13. 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 Харківського національного аграрного університету, серія біологія, 2012, вип.2(26). – с.54-60

14. Тихонов П.С., Тихонова Т.В. Оптимізація процесу виділення лектинів з зародків пшениці // Аграрний вісник Причорномор'я. Збірник наукових праць. – Одеса, 2006. – вип. 32. – с.146-147.

15. Тихонов П.С., Тихонова Т.В. Афинна хроматографія лектинів з зародків пшениці // Аграрний вісник Причорномор'я. Збірник наукових праць. – Одеса, 2006. – вип. 35. – с.39-41.
16. Фримель Г. Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – 472с.
17. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. – Львов: Выща школа, 1981. – 155с.
18. Лихацький В.І. Біологія і агротехніка вирощування часнику. – К.: УСГА, 1992. – 27с.
19. Комиссаров В.А., Карлович С.В. Площади питания и урожай чеснока // Вестник с.-х. науки. – 1971. – № 12. – с.73-75.
20. Комиссаров В.А., Карлович С.В. Биолого-агротехнические особенности культуры чеснока из зубков и воздушных луковичек // Изв. ТСХА. – 1971. – вып. 1. – с.148-155.
21. Попова Л.М. Часник в Україні. Навчальний посібник. – Одеса: ВМВ, 2011. – 160с.

***Тихонов П.С. Углеводная специфичность и активность лектинов клеточных стенок луковиц чеснока (*Allium sativum* L.) культурного сорта и дикорастущего вида, различающихся по устойчивости к фузариозу.***

*Определили углеводную специфичность и активность лектинов луковиц чеснока (*Allium sativum* L.) культурного сорта и дикого вида, различающихся по устойчивости к фузариозу. Предположили, что исследуемые параметры участвуют в формировании резистентности чеснока к патогенам *Fusarium spp.**

**Ключевые слова:** лектины; углеводная специфичность и активность, луковицы чеснока, устойчивость к фузариозу.

***Tykhonov P.S. Carbohydrate specificity and activity of lectins in the cell walls of garlic bulbs (*Allium sativum* L.) of a cultivar and wild-growing species, differing in resistance to fusariosis.***

*The carbohydrate specificity and activity of lectins of garlic bulbs (*Allium sativum* L.) of a cultivar and wild species, differing in their resistance to fusarium, were determined. It was assumed that the parameters studied are involved in the formation of resistance of garlic to the pathogens of *Fusarium spp.**

**Key words:** lectins; carbohydrate specificity and activity, garlic bulbs, resistance to fusariosis.