

А.В. ВІТЕР¹, О.В. ДМИТРІЄВ², О.І. ДЗЮБА¹

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України
Україна, 01014 м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 01033 м. Київ, вул. Володимирська, 64

ВЛАСТИВОСТІ ЛЕКТИНІВ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ, ВИРОЩЕНОЇ ЗА ЗМІНЕНОЇ ДІЇ ГРАВІТАЦІЇ

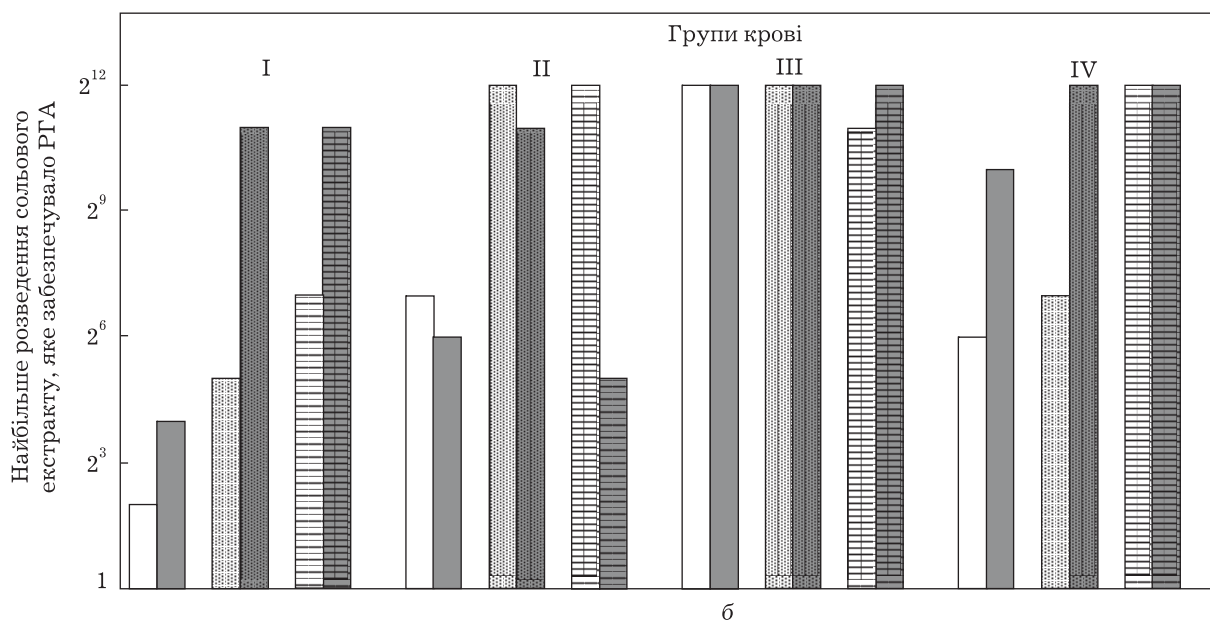
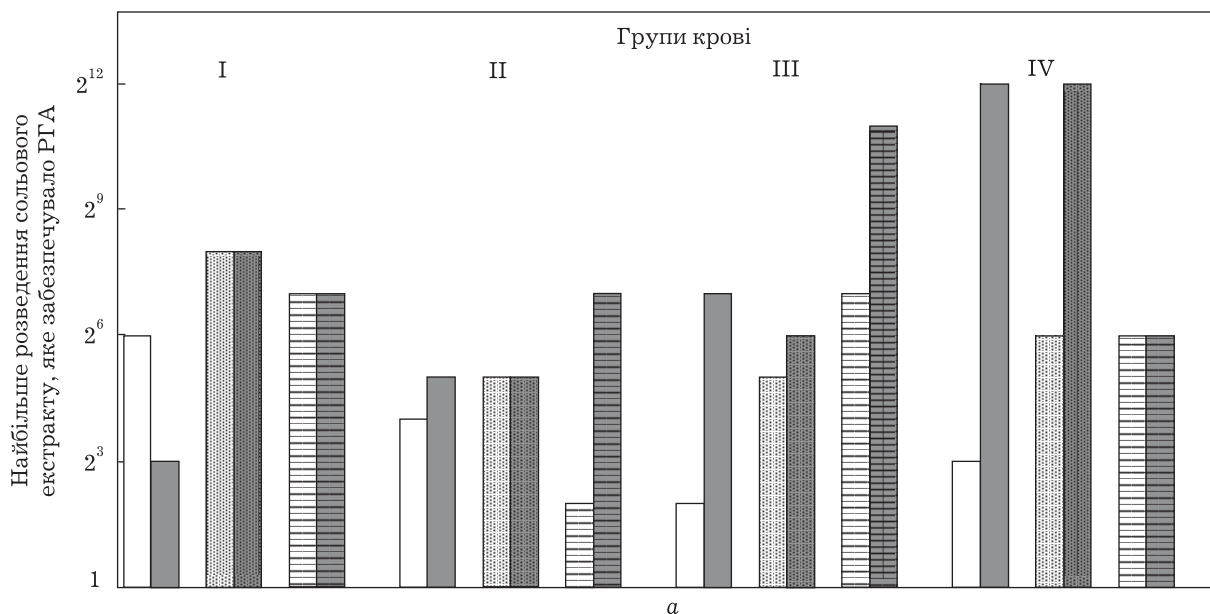
*Досліджено взаємодію білків з надземної частини рослин люцерни посівної (*Medicago sativa* L.) сорту Ярославна віком 30 та 50 діб, вирошених за різної орієнтації відносно вектора гравітації з D-арабінозою, D-рамнозою, D-сахарозою та еритроцитами чотирьох груп людської крові. Аномальне розміщення рослин у гравітаційному полі стимулювало гемолітичну активність, особливо у разі передпосівної обробки пророщеного насіння штамом *Sinorhizobium meliloti* 441. Найкращим індикатором зміни активності лектинів виявились еритроцити від донорів з III та IV групами крові.*

Космічні закриті системи життєзабезпечення вимагають надійності як окремих компонентів, так і взаємозв'язків між ними. Наші дослідження показали принципову можливість формування продуктивного бобово-ризобіального симбіозу за умов імітованої мікрогравітації. Загалом інтродукція рослин у космічні оранжереї передбачає дослідження низки аутокологічних питань та питань взаємодії вищих фототрофів з іншими компонентами закритих екосистем (консументами, редуцентами, симбіонтами, патогенами та паразитами) у модельних умовах — під впливом кліностагування. Одним із зручних інструментів для вивчення фізіолого-біохімічного стану рослин є дослідження їхніх гемаглютининів, оскільки властивості цих білків відображують комплекс важливих характеристик рослин.

Дослідження гемолітичної та вуглеводної активності білків з бобових рослин свідчить про придатність рослинного матеріалу як харчових або лікарських засобів для організмів-консументів з різними особливостями клітин крові [8]. Під час стресів підвищується властивість деяких глікопротеїнів людини зв'язуватися з рослинними лектинами. Такі глікопротеїни запро-

поновано використовувати як діагностичні маркери стресів людського організму ще до появи виражених симптомів [12]. Показано, що перебування в космічному польоті призводило до послаблення специфічних відповідей Т-лімфоцитів на дію фітогемаглютининів в умовах *in vitro* [17].

Активність рослинних лектинів зростає в ході онтогенезу, під дією збудників захворювань, а також абіотичних стресорів [1]. Наприклад, осмотичний стрес спричиняє вироблення в коренях рису лектину, що зв'язує манозу [13]. Вироблення лектинів у підсім'ядольних колінах сої зазнає змін за дії холодного стресу [11]. Опірність рослин стресорам можна стимулювати завдяки попередньому застосуванню лектинів, що показано на прикладі підвищення солестійкості проростків пшениці *Triticum aestivum* L. [4] або стійкості рослин цього виду до УФ-опромінення [5]. Н. Ланноо зі співавт. [15] виявили, що екзогенна жасминова кислота та її метиловий ефір підсилюють синтез лектинів, спричинений стресами. Цей ефект на інтактних рослинах виявляється більшою мірою, ніж на висічках з листків. Нещодавні дослідження свідчать про те, що у відповідь на холодний стрес листки виробляють N-глікозилзовані біл-



- | | | |
|---|--|--|
| Звичайний стаціонар зі спонтанним зараженням | Звичайний стаціонар з індукованою інокуляцією <i>S. meliloti</i> 441 | Перевернутий стаціонар зі спонтанним зараженням |
| Перевернутий стаціонар з індукованою інокуляцією <i>S. meliloti</i> 441 | Кліноштатування зі спонтанним зараженням | Кліноштатування з індукованою інокуляцією <i>S. meliloti</i> 441 |

Титр реакції гемаглютинації екстрактів з надземної частини *Medicago sativa* сорту Ярославна відносно вихідних солевих екстрактів рослини віком: а — 30 діб; б — 50 діб

ки, які аглютинують з лектинами [14]. Є повідомлення про причетність фітогемаглютининів до регуляції окисного стресу, перебудови цитоскелета [1], обговорюється можливість їхньої взаємодії з гістонами [16].

Відомо також про інші важливі властивості лектинів: зв'язування бульбочкових бактерій зі специфічним складом (залишками) екзополісахаридів [7] і про позитивну кореляцію між гемолітичною та алелопатичною активностями рослинних білків [3].

Існує думка, що імітована мікрогравітація може впливати на рослини як значний стресор [6]. За даними наших попередніх досліджень, симбіотична азотфіксація сприяє пристосуванню рослин до його дії, тому метою цього експерименту було виявити залежність лектинової активності люцерни посівної (*Medicago sativa* L.) від зміни дії гравітації та взаємодії рослин з високоефективним штамом *Sinorhizobium meliloti* 441.

У нашому експерименті, крім кліностакування рослин, випробовували вплив постійної 180° переорієнтації рослин відносно поверхні Землі. Цей варіант слугував для перевірки ефектів, спричинених власне орієнтацією рослин у гравітаційному полі, адже кліностакування лише імітує невагомість завдяки циклічній зміні положення рослин у гравітаційному полі, не усуваючи фактора сили земного тяжіння.

Матеріали та методи

У дослідженнях використовували насіння *M. sativa* сорту Ярославна з селекційного розсадника ННЦ «Інститут землеробства» НААН, штам *Sinorhizobium meliloti* 441 (музейна колекція Інституту фізіології рослин та генетики НАН України), який відзначається високою здатністю вступати в ефективний азотфіксувальний симбіоз з рослинами. Експеримент проводили в культурі скляних контейнерів, заповнених мінеральним волокном Grodan (Нідерланди),

вологість якого підтримували живильним розчином за [10] на рівні 700 % від сухої маси за 15-годинного освітлення 2,5 клк.

Випробування рослин проводили за схемою двофакторного дослідження. Суть першого фактора — 3 варіанти розміщення рослин відносно вектора сили земного тяжіння на досліджуваній об'єкт: 1) звичайний стаціонар (контроль); 2) двохосьове кліностакування (частота обертання за осями становила 0,11 та 0,48 об./хв) — періодична зміна орієнтації рослин у гравітаційному полі, що імітує невагомість; 3) постійна 180° переорієнтація рослин: пагони спрямовані до Землі, а корені — від Землі (перевернутий стаціонар). В усіх варіантах пагони рослин були постійно орієнтовані до ламп освітлення — це дало змогу розмежувати ефекти умов освітлення та гравітаційного поля Землі. Другим фактором був спосіб зараження *M. sativa* бульбочковими бактеріями: 1) спрямована передпосівна інокуляція стерильного (30 хв у 70 % етиловому спирті з наступним промиванням) пророщеного насіння зазначеним штамом; 2) неконтрольоване зараження коренів ризобіями (контроль).

Відбір рослинного матеріалу проводили у віці 30 і 50 діб. Визначення вуглеводзв'язувальної активності екстрактів (1 ч. сирих пагонів/10 ч. фізіологічного розчину) проводили на 10 % розчинах D-арабінози, D-рамнози та D-сахарози, реакції гемаглютинації (РГА) лектинів — за модифікованим методом [8], валового вмісту білка у висушених пагонах — за [9]. Повторність експериментів — триразова.

Результати та обговорення

Випробування сольових екстрактів білків з пагонів *M. sativa* в поставлених нами експериментах на спорідненість до D-арабінози, D-рамнози і D-сахарози дало позитивну реакцію лише з останнім вуглеводом. Як відомо, екзополісахариди *S. meliloti*, що є специфічними до *M. sativa*, містять переважно залишки галактози та глюкози [7].

Глюкозний залишок входить також до складу сахарози, тому можна очікувати, що високий рівень вироблення лектинів *M. sativa* (зокрема, показаний нашими експериментами) корелюватиме зі здатністю рослин до зв'язування видоспецифічних ризобій на коренях.

Наступним етапом дослідження було випробування гемолітичної активності солевих екстрактів з пагонів рослин (рисунк).

Зміна здатності рослинних екстрактів до взаємодії з вуглеводними компонентами, в тому числі з розміщеними на поверхні еритроцитів, може бути наслідком двох внутрішніх процесів: 1) загальних змін вмісту білка у фітомасі та 2) зміни здатності білка до взаємодії з вуглеводними залишками, що можна пояснити конформаційними змінами фітогемаглютининів або підвищенням їхньої частки в загальному пулі білків. Виходячи з цього, ми вважали, що інтегральним показником лектинової активності утвореного рослинами білка може слугувати десятковий логарифм

оберненого добутку цих двох параметрів (відносна лектинова активність білка)

$$\lg \frac{1}{w_{\text{білка}} \times \text{РГА}}$$

де w — вміст білка (% на суху речовину), а РГА — титр сухої речовини рослинного матеріалу в сольовому розчині (РГА = 10 × титр відносно вихідного сольового екстракту × частка сухої речовини в аналізованих пробах пагона). Значення відносної лектинової активності білка відображує максимальне розведення білка, яке забезпечує зсідання еритроцитів. Теоретично, цей показник дорівнює одиниці, якщо зсідання спричиняє екстракт, який містить 1 % валового білка. Результати аналізу екстрактів з *M. sativa* за цим показником наведено в таблиці.

Аналіз наведених у таблиці даних свідчить, що:

1. Білки люцерни посівної з еритроцитами III і IV групи крові аглютинували значно краще, ніж із еритроцитами I групи. II група відзначалася проміжним рівнем РГА.

Вплив індукованої інокуляції та зміненої дії гравітації на відносну лектинову активність білка рослин *Medicago sativa* сорту Ярославна

Вік рослин, діб	Варіант	Показник $\lg \frac{1}{w_{\text{білка}} \times \text{РГА}}$ для груп крові			
		I	II	III	IV
30	Звичайний стаціонар (контроль) зі спонтанним зараженням	2,0	1,4	0,8	1,1
	Звичайний стаціонар (контроль) з індукованою інокуляцією	1,1	1,7	2,3	3,8
	Перевернутий стаціонар зі спонтанним зараженням	2,6	2,0	1,7	2,0
	Перевернутий стаціонар з індукованою інокуляцією	1,7	2,6	1,4	3,8
	Кліностакування зі спонтанним зараженням	2,4	0,9	2,4	2,1
50	Кліностакування з індукованою інокуляцією	2,3	2,3	3,5	2,0
	Звичайний стаціонар (контроль) зі спонтанним зараженням	0,8	2,3	3,8	2,0
	Звичайний стаціонар (контроль) з індукованою інокуляцією	1,4	2,0	3,8	3,2
	Перевернутий стаціонар зі спонтанним зараженням	1,7	3,8	3,8	2,3
	Перевернутий стаціонар з індукованою інокуляцією	4,8	4,8	5,1	5,1
	Кліностакування зі спонтанним зараженням	2,3	3,8	3,8	3,8
	Кліностакування з індукованою інокуляцією	3,5	1,7	3,8	3,8

2. Зі збільшенням віку рослин *M. sativa* здатність лектинів аглютинувати з людськими еритроцитами поліпшувалася, що особливо було характерне для III і IV груп крові.

3. Тенденція до посилення РГА як у 30-добових, так і в 50-добових рослин виявлялась однаковою чином: звичайний стаціонар < кліностакування < перевернутий стаціонар. Можна вважати, що саме добре виражена РГА в перевернутому стаціонарі та незначною мірою слабша під дією кліностакування свідчить про особливо стресовий вплив умов зміненої гравітації на рослини та хорошу адаптаційну здатність рослин *M. sativa* до цих стресорів.

4. Білки спонтанно заражених рослин виявляли дещо гіршу РГА порівняно з білками рослин індуковано інокульованого варіанта. Ми пояснюємо цей факт тим, що сприятливе забезпечення азотом дало змогу краще реалізуватися потенціалу рослин щодо формування тих структур білкових макромолекул, які потрібні для вступу у взаємодію з еритроцитами. Водночас у варіантах спонтанного зараження нестача азоту перешкоджала реалізації цієї генетичної здатності рослин.

Висновки

Проведений експеримент дає підстави припустити, що білки, здатні зв'язувати вуглеводи, причетні до адаптивної відповіді *Medicago sativa* на екстремальні умови, спричинені зміною положення рослин відносно вектора сили тяжіння. Зі збільшенням віку рослин з 30 до 50 діб не тільки зростає кількість білків, а й їхня відносна лектинова активність, яка посилюється в умовах повноцінного азотного живлення внаслідок симбіозу рослин з високоефективним штамом *Sinorhizobium meliloti* 441. Виявлення великих відмінностей у гемолітичній активності екстрактів з рослин *M. sativa* щодо еритроцитів, одержаних від донорів з різними групами крові, дає підстави стверджувати, що для застосування

рослин *M. sativa* як харчового або лікарського продукту необхідно проводити попередню оцінку РГА для кожної людини окремо. Необхідно пам'ятати про те, що система груп крові відповідає тільки одному з численних видів антигенних детермінант, що містяться на поверхні еритроцитів людини [2], тому не виключено, що в РГА люцернових лектинів визначальними є поверхневі структури еритроцитів, відмінні від тих, якими визначається система АВ0. На нашу думку, уявлення про гемолітичну активність білків *M. sativa* можна розширити завдяки дослідженням їхньої взаємодії з еритроцитами сільськогосподарських тварин, що сприяло б поліпшенню раціонів годівлі. Особливо це актуально для таких космічних місій, де можна досягти тривалого вегетаційного періоду для цього виду рослин. Зростання лектинової активності пагонів у відповідь на зміну положення рослин *M. sativa* відносно гравітаційного вектора свідчить про те, що розширені дослідження білків цього виду можуть доповнити уявлення про відповідь рослин на екстремальний вплив фактора гравітації.

1. Бабоша А.В. Индуцибельные лектины и устойчивость растений к патогенным организмам и абиотическим факторам // Биохимия. — 2008. — 73, № 7. — С. 812–825.

2. Вершигора А.Е. Общая иммунология: Учеб. пособие. — К.: Вища шк., 1990. — 736 с.

3. Дзюба О.І., Соляник О.В. Біологічна активність лектинів деяких представників родини Ericaceae // Проблеми фізіології рослин і генетики на рубежі III тисячоліття: Матеріали VII конф. молодих вчених (Київ, 2000 р.). — К.: Б.в., 2000. — С. 29.

4. Кильдибекова А.Р., Безрукова М.В., Авальбаев А.М. и др. Механизмы защитного влияния агглютинина зародыша пшеницы на рост клеток корневых проростков пшеницы при засолении // Цитология. — 2004. — 46, № 4. — С. 312–316.

5. Кириченко О.В., Перковська Г.Ю. Вплив екзогенного лектину пшениці на вміст флавоноїдів та зміну лектинової активності у проростках пшениці за умов ультрафіолетового опромінення // Біополімери і клітина. — 2005. — 21, № 5. — С. 413–418.

6. Косаківська І.В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. — К.: Сталь, 2003. — 156 с.
7. Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. — К.: Наук. думка, 2007. — 316 с.
8. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. — Львов: Вища школа, 1981. — 192 с.
9. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. — К.: Наук. думка, 1976. — 334 с.
10. Шильникова В.К., Нестерова Н.М. Влияние кислотности среды на процесс инфицирования клевера клубеньковыми бактериями // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1969. — № 3. — С. 445–448.
11. Aghaei K., Ehsanpour A.A., Shah A.H., Komatsu S. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress // Amino Acids. — 2009. — 36, N 1. — P. 91–98.
12. Barisic K., Lauc G., Dumic J. et al. Changes of glycoprotein patterns in sera of humans under stress // Europ. J. Clin. Chem. & Clin. Biochem. — 1996. — 34, N 2. — P. 97–101.
13. Branco A.T., Bernabé R.B., dos Santos Ferreira B. et al. Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.) // Protein Expression and Purification. — 2004. — 33, N 1. — P. 34–38.
14. Komatsu S., Yamada E., Furukawa K. Cold stress changes the concanavalin A-positive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths // Amino Acids. — 2009. — 36, N 1. — P. 115–123.
15. Lannoo N., Vandendorre G., Miersch O. et al. The jasmonate-induced expression of the *Nicotiana tabacum* leaf lectin // Plant and Cell Physiol. — 2007. — 48, N 8. — P. 1207–1218.
16. Schouppé D., Ghesquière B., Menschaert G. et al. Interaction of the tobacco lectin with histone proteins // Plant Phys. — 2011 (El. pub. ahead of print).
17. Taylor G.R., Dardano J.R. Human cellular immune responsiveness following space flight // Aviat., Space & Environ. Med. — 1983. — Vol. 52, Issue 12, Pt. 2. — P. S55–S59.

Рекомендувала до друку Н.В. Заїменко

А.В. Витер¹, А.В. Дмитриев², О.І. Дзюба¹

¹ Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Украина, г. Киев

² Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Украина, г. Киев

СВОЙСТВА ЛЕКТИНОВ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ, ВЫРАЩЕННОЙ ПРИ ИЗМЕНЕННОМ ДЕЙСТВИИ ГРАВИТАЦИИ

Исследовано взаимодействие белков надземной части растений люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) сорта Ярославна в возрасте 30 и 50 суток, выращенных в условиях различной ориентации относительно вектора гравитации с *D*-арабинозой, *D*-рамнозой, *D*-сахарозой и эритроцитами четырех групп крови человека. Аномальное размещение растений в гравитационном поле стимулировало гемолитическую активность, особенно в случае предпосевной обработки пророщенных семян штаммом *Sinorhizobium meliloti* 441. Наилучшим индикатором изменения активности лектинов оказались эритроциты от доноров с III и IV группами крови.

А.В. Витер¹, О.В. Дмитриев², О.І. Дзюба¹

¹ М.М. Gryshko National Botanical Gardens, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Kyiv

² Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine, Kyiv

LECTINS PROPERTIES UNDER CULTIVATION OF ALFALFA IN ALTERED GRAVITY CONDITIONS

Proteins from aerial portion of 30- and 50-days plants of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cv. Yaroslavna which grown under various orientation with regard to gravitational vector were tested to interact with *D*-arabino-, *D*-ramnose, *D*-sucrose and erythrocytes of 4 human blood groups. Salt extracts hemolytic activity was stimulated by abnormal arrangement of plants in gravitational field of the Earth, especially under treatment of sprouted seeds with *Sinorhizobium meliloti* str. 441. Erythrocytes of donors with the 3rd and the 4th human blood groups were observed to be the best indicator among the other blood groups.