

УДК 581.1.036/032

ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЛЕКТИНА ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБНЫМИ ПАТОГЕНАМИ И ДЕЙСТВИИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2012 г. **О. О. Молодченкова¹, В. Г. Адамовская¹,
В. Е. Досенко², П. С. Тихонов³**

¹Селекционно-генетический институт –
Национальный центр семеноведения и сортоизучения
Национальной академии аграрных наук Украины
(Одесса, Украина)

²Институт физиологии им. А.А. Богомольца
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)

³Одесский государственный аграрный университет
(Одесса, Украина)

Установлены различия уровня лектиновой активности и содержания мРНК лектинов у растений разных по устойчивости к патогенам сортов пшеницы при инфицировании *Fusarium graminearum*, *Alternaria* spp. и действии салициловой кислоты. Сделан вывод, что увеличение лектиновой активности и уровня экспрессии генов лектинов является одной из защитных реакций растительного организма пшеницы на действие грибных патогенов и салициловой кислоты, которая имеет свои особенности в зависимости от устойчивости сорта и воздействующего фактора.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *Fusarium graminearum*, *Alternaria* spp., лектиновая активность, лектины, экспрессия генов

Фитозаболевания вызывают большие потери урожая сельскохозяйственных культур и являются основными факторами, лимитирующими увеличение производства сельскохозяйственной продукции. Поэтому важное значение приобретает изучение молекулярных основ устойчивости растений к фитозаболеваниям, в частности, к грибным патогенам, таким как фузариоз и альтернариоз. В настоящее время в литературе обсуждается вопрос об участии лектинов в распознавании патогенных микроорганизмов и формировании защитных механиз-

мов растения. Лектины – белки, способные обратимо и специфически связывать углеводные остатки различной химической природы (Бабоша, 2008). Возможная защитная роль лектинов при фитозаболеваниях рассматривается в связи с их способностью специфически взаимодействовать с углеводными компонентами на поверхности клеток патогенов, что приводит к угнетению их роста. Кроме того, они могут быть эффекторами для включения сигнальных систем, активирующих реакции устойчивости растения (Шакирова, 2001; Кириченко, Сергиенко, 2006).

Одним из признаков вовлечения белков в реакцию устойчивости/восприимчивости растения является количественное изменение их содержания или активности (Комарова и др.,

Адрес для корреспонденции: Молодченкова Ольга Олеговна, Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Овидиопольская дорога 3, г. Одесса, 65036, Украина;
e-mail: olgamolod@ukr.net

1993). Анализ уровня лектиновой активности, а также изучение особенностей экспрессии генов лектина у различающихся по устойчивости к фитозаболеваниям сортов растений при инфицировании патогенами позволит приблизиться к пониманию биологической и защитной роли этих белков при патогенезе. Исходя из этого, целью данного исследования было изучение активности лектинов и характера экспрессии генов лектина в проростках пшеницы, различающихся по устойчивости к возбудителям фузариоза и альтернариоза, при инфицировании патогенами и действии индуктора устойчивости – салициловой кислоты.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.), различающихся по устойчивости к возбудителям фузариоза и альтернариоза (устойчивый к фузариозу сорт Ласточка одесская, устойчивый к альтернариозу сорт Виктория, восприимчивый к фузариозу и альтернариозу сорт Одесская полукарликовая).

Проростки выращивали на протяжении 4 сут при 24°C на воде (контроль), на инфекционном фоне (сильнопатогенные штаммы K90 *Fusarium graminearum* и *Alternaria* spp.) и на 2 mM растворе салициловой кислоты.

Лектины извлекали из фракции клеточных стенок проростков (Комарова и др., 1993). Для этого навеску массой 2 г гомогенизировали в 6 мл среды, содержащей 20 mM калий фосфатного буфера pH 7,4; 0,05 mM фенилметилсульфонилфторида, 0,5 mM дитиотрейтола, 0,36 M сахарозу и 10 mM ЭДТА. Гомогенат фильтровали через два слоя хлопчатобумажной ткани. Полученный осадок трижды промывали калий фосфатным буфером (pH 7,4). Надосадочную жидкость отбрасывали, а из осадка извлекали лектины исходным раствором, но с добавлением 0,9% NaCl и 0,05% раствора детергента Тритона X-100 в течение 4 часов и центрифугировали при 20000 об./мин в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, а в супернатанте определяли лектиновую активность.

Активность лектинов определяли в планшетках для иммунологических исследований по их способности агглютинировать трипсинизированные эритроциты белых крыс при комнатной температуре. Лектиновую активность рассчитывали по минимальному количеству белка, вызывающему агглютинацию эритроцитов (мкг белка/мл)⁻¹. Эритроциты получали

и трипсинизировали по методу Луцика (Луцик и др., 1981).

Определение экспрессии гена лектина (TaGLLc) по количеству мРНК проводили методом обратной транскрипции полимеразно-цепной реакции в реальном времени (RT-PCR). Данные о нуклеотидных последовательностях гена лектина получили из нуклеотидной базы Национального Центра Биотехнологической Информации США (National Center for Biotechnology Information US) (PubMed). Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer3 (version 0.4.0). РНК выделяли из тканей проростков методом фенол-хлороформной экстракции (Маниатис, 1984). Концентрацию РНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies Inc, США).

Обратную транскрипцию проводили с использованием First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), применяя 100-150 нг тотальной РНК и рандомный гексамерный праймер. Полученная в результате обратной транскрипции кодидующая ДНК (кДНК) использовалась для количественной ПЦР-амплификации (7500 Fast Real-time PCR System, Applied Biosystems, США) с применением следующих пар праймеров (Метабион, Германия): TUBB Up: 5'-CAAGGAGGTGGACGAGCAGATG-3'; TUBB Dw: 5'-GACTTGACGTTGTTGGGGATCCA-3' (эндогенный контроль); Triticum isolectin Up: 5'-ССААСТССАСТСТТСТССААГ-3'; Triticum isolectin Dw: 5'-GTAAGTCAAGGGAACCGTAGG-3'. Смесь для амплификации состояла из 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, США) и 30 пМ соответствующих праймеров. Объем доводили до 20 мкл деионизированной водой. Программа амплификации начиналась после предварительной активации AmpliTaq ДНК-полимеразы на протяжении 10 мин при 94°C и состояла из 40 циклов: денатурация – 94°C, 15 с, присоединение праймеров и элонгация – 60°C, 1 мин. Для контроля за специфичностью флуоресценции продукта амплификации добавляли стадию диссоциации: последовательное повышение температуры от 60°C до 94°C с регистрацией падения интенсивности флуоресценции комплексов двухцепочечных ДНК с SYBR Green. Анализ полученных данных проводился с помощью 7500 Fast Real-time PCR Software (рис. 1).

ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

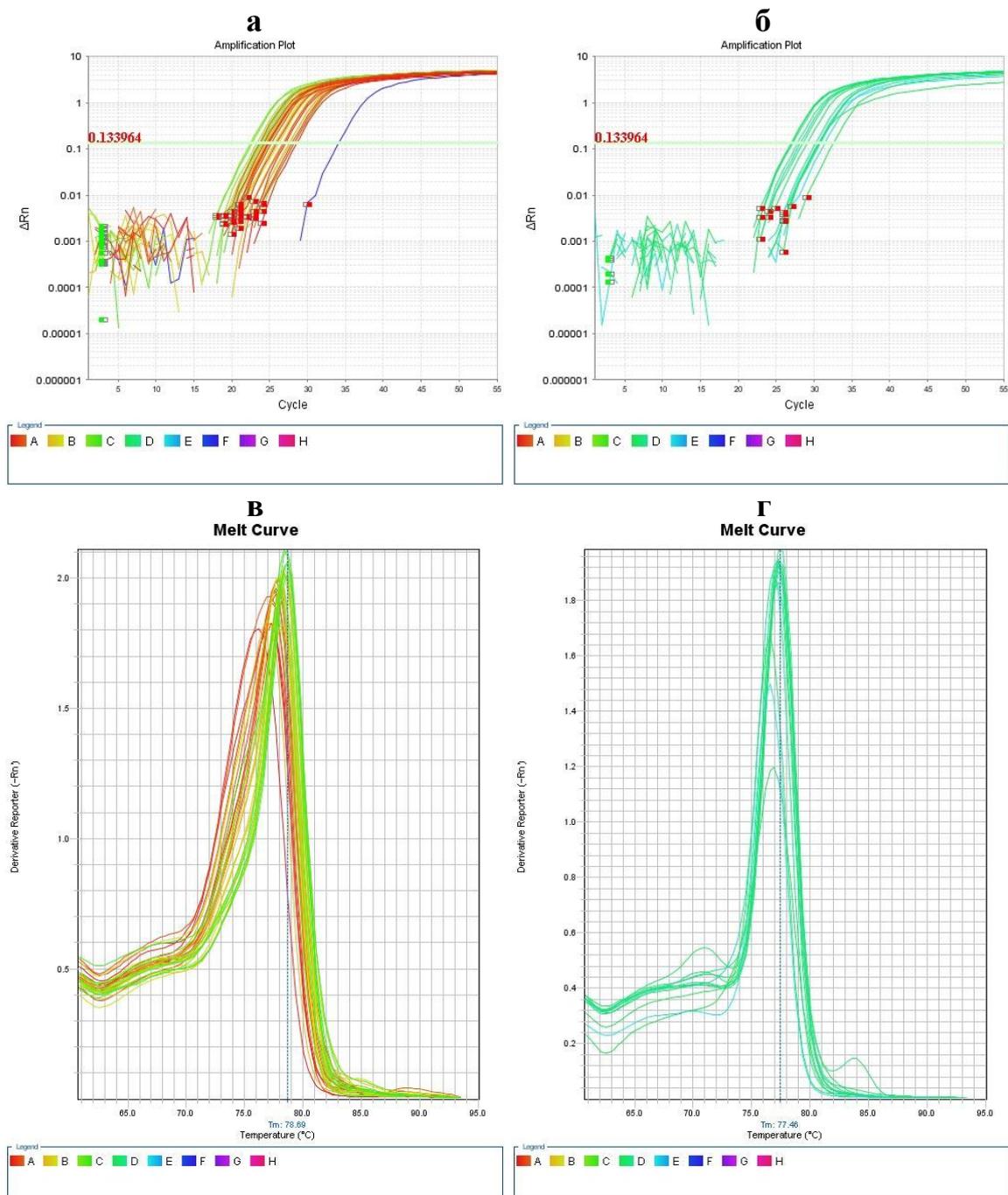


Рис. 1. Флюорограммы RT-PCR на наличие экспрессии гена лектина в проростках пшеницы. а – продукты амплификации контрольного гена; б – продукты амплификации гена лектина; в – специфический продукт амплификации контрольного гена; г – специфический продукт амплификации гена лектина.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием общепринятых методов и стандартных программ математического обеспечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование экспрессии гена лектина в проростках пшеницы при инфицировании грибными патогенами и действии салициловой

кислоты показало следующее. У устойчивого к возбудителям фузариоза сорта было установлено увеличение количества мРНК на всех изучаемых фонах проращивания относительно контрольных проростков (салициловая кислота, *Fusarium graminearum*, СК + *Fusarium graminearum*). У устойчивого к возбудителям альтернариоза сорта происходило увеличение количества мРНК при действии салициловой кислоты (в 1,2 раза относительно контроля), а

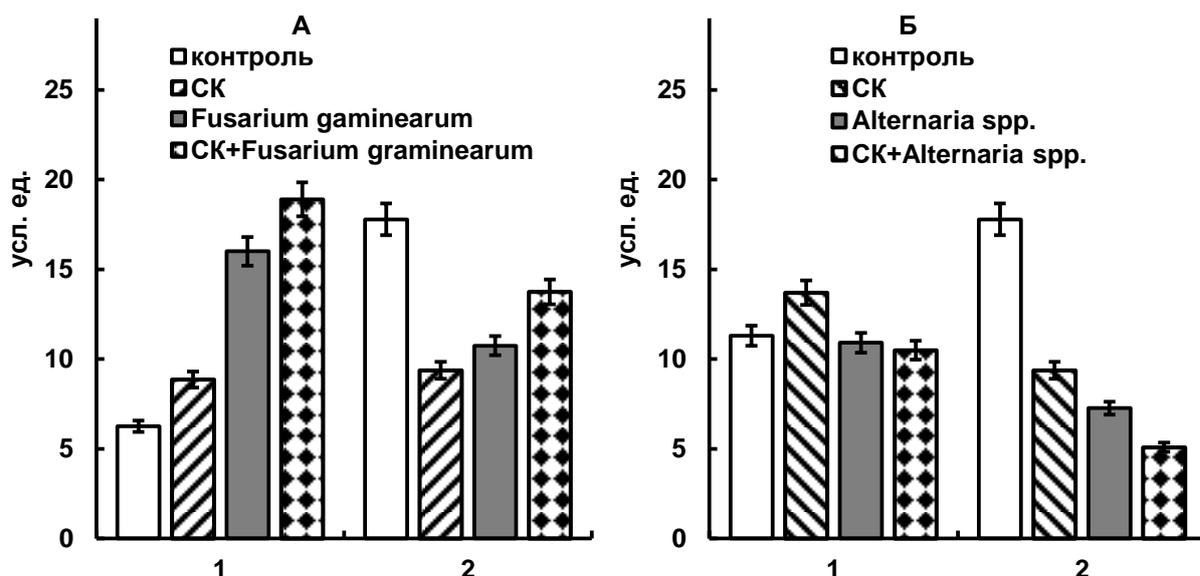


Рис. 2. Экспрессия гена лектина (усл. ед.) в проростках пшеницы при действии салициловой кислоты и инфицировании возбудителями фузариоза и альтернариоза.

Здесь и на рис. 3: А – инфицирование *Fusarium graminearum*; Б – инфицирование *Alternaria* spp. 1 – устойчивый сорт; 2 – восприимчивый сорт.

Представлены средние данные из трех повторностей и их стандартные ошибки.

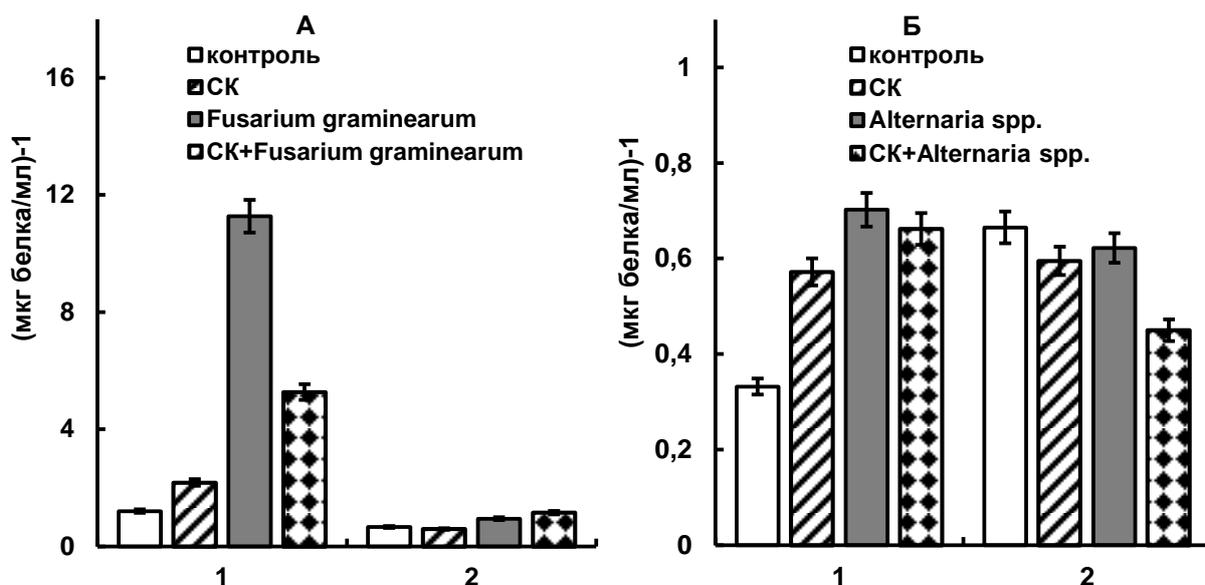


Рис. 3. Лектиновая активность в проростках пшеницы при действии салициловой кислоты и инфицировании возбудителями фузариоза и альтернариоза.

при инфицировании и совместном действии салициловой кислоты и патогена наблюдалось незначительное снижение количества мРНК по отношению к контролю. У восприимчивого к патогенам сорта на всех фонах проращивания было отмечено снижение количества мРНК относительно контроля (рис. 2).

Дальнейшее изучение активности лектинов в проростках пшеницы при инфицировании возбудителями фузариоза и альтернариоза поз-

волило установить увеличение лектиновой активности в 9,4 и 2,1 раза по отношению к контролю у устойчивых к возбудителям фузариоза и альтернариоза сортов пшеницы соответственно. В проростках восприимчивого к патогенам сорта при инфицировании возбудителями фузариоза наблюдалось увеличение активности лектинов в 1,4 раза по отношению к контролю, но оно было в 6,7 раз ниже по сравнению с индукцией лектиновой активности у

устойчивого сорта. При инфицировании проростков восприимчивого сорта возбудителями альтернариоза происходило снижение активности лектинов по отношению к контролю (рис. 3). Аналогичные закономерности изменения лектиновой активности наблюдались в проростках пшеницы при действии салициловой кислоты и совместном действии этих двух факторов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Защита от патогенов – одна из важных функций, выполняемых лектинами в клетках растения (Peumans et al., 1995; Шакирова, 2001). Многими исследователями было показано, что содержание лектинов и их активность повышаются в ответ на инфицирование разными патогенами и действие индукторов, таких как салициловая кислота, в особенности у устойчивых растений (Gibson et al., 1982; Шакирова и др., 1990; Бабоша, Ладыгина, 1992). Такие изменения лектиновой активности при действии патогенов и салициловой кислоты могут быть обусловлены, с одной стороны, конформационными перестройками белковых молекул, в ходе которых изменяется доступность углевод-связывающих центров, а с другой стороны – уровнем экспрессии генов лектина при данных воздействиях. Известно, что в зародышах пшеницы существует пул запасных форм лектиновых мРНК (Peumans et al., 1982), что обуславливает быстрое увеличение содержания лектина за счет синтеза белка. Высказано предположение, что увеличение содержания лектинов может происходить как за счет индукции гена лектина и усиления синтеза лектиновых мРНК, так и за счет ранее синтезированных мРНК (Шакирова, 2001).

В проведенных нами исследованиях было показано, что у устойчивого к возбудителям фузариоза сорта пшеницы на всех фонах проращивания наблюдалось увеличение уровня экспрессии гена лектина и лектиновой активности. Это свидетельствует о том, что формирование защитной реакции проростков данного сорта пшеницы при инфицировании фузариозными патогенами и действии салициловой кислоты связано с интенсификацией экспрессии гена лектина и уровня активации данного белка. У устойчивого к возбудителям альтернариоза сорта увеличение уровня экспрессии гена лектина наблюдалось только при воздействии салициловой кислоты. При инфицировании *Alternaria* spp., совместном действии патогена и салициловой кислоты количество лектиновых

мРНК практически не изменялось, а лектиновая активность увеличивалась относительно контроля. По всей видимости, увеличение лектиновой активности в проростках пшеницы данного сорта при заражении *Alternaria* spp. происходило за счет ранее синтезированных лектиновых мРНК. У восприимчивого сорта к обоим патогенам наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии гена лектина на всех фонах проращивания. При инфицировании патогенами снижение уровня экспрессии гена лектина и незначительное повышение или снижение лектиновой активности может быть связано с менее интенсивной скоростью формирования защитных реакций у проростков восприимчивого сорта по сравнению с устойчивыми сортами и, как следствие, угнетением биосинтетической активности пораженных тканей растения, в том числе процессов активации лектинов. Аналогичные тенденции по изменению уровня экспрессии генов лектина и лектиновой активности у данного сорта наблюдались под влиянием салициловой кислоты, что свидетельствует о сходных механизмах активации лектинов при действии данных факторов. Предварительная обработка зерна восприимчивого сорта салициловой кислотой с последующим инфицированием *Fusarium graminearum* приводило к увеличению лектиновой активности, которое, по всей видимости, происходило за счет уже имеющегося пула запасных мРНК и направлено на повышение устойчивости растения к данному патогену.

Таким образом, одной из составляющих защитной реакции растений пшеницы на инфицирование возбудителями фузариоза и альтернариоза является активация экспрессии гена лектина и последующее увеличение лектиновой активности. Изменение уровня экспрессии гена лектина и лектиновой активности при грибной инфекции имеет свои особенности в зависимости от устойчивости сорта и патогена. Установленные в данной работе изменения активности лектинов под действием салициловой кислоты свидетельствуют об участии салициловой кислоты в цепи сигнальных путей, ведущих к изменению экспрессии генов лектинов и возможности регуляции салициловой кислотой защитных реакций зерновых культур с участием лектинов.

ЛИТЕРАТУРА

Бабоша А.В., Ладыгина М.Е. Физиолого-биохимические и биофизические методы диагностики степени устойчивости растений к патогену.

- нам и другим факторам. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992. – С. 43-52.
- Бабоша А.В.* Индуцибельные лектины и устойчивость растений к патогенным организмам и абиотическим стрессам // Биохимия. – 2008. – Т. 73, Вып. 7. – С. 1007-1022.
- Кириченко О.В., Сергієнко В.Г.* Фунгітоксична активність рослинних лектинів // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 6. – С. 526-534.
- Комарова Э.Н., Выскребенцева Э.И., Трунова Т.И.* Изменение лектиновой активности клеточных стенок этиолированных проростков озимой пшеницы в процессе закаливания к морозу // Докл. АН [Россия]. – 1993. – Т. 329, № 5. – С. 680-685.
- Луцки М.Ф., Панасик Е.Н., Луцки А.Д.* Лектины. – Львов: Выща школа, 1981. – 150 с.
- Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
- Шакирова Ф.М., Хайруллин Р.М., Ямалеев А.М.* Сравнительный анализ содержания лектина и абсцисовой кислоты в проростках пшеницы, инфицированных корневыми гнилями // Иммуноферментный анализ регуляторов роста растений. Применение в физиологии растений и экологии. – Уфа: БНЦ УрО АН СССР, 1990. – С. 38-41.
- Gibson D.M., Stack S., Krell K., House J.* A comparison of soybean agglutinin in cultivars resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Race 1) // Plant Physiol. – 1982. – V. 70. – P. 560-566.
- Peumans W.J., Stinissen H.M., Garlier A.R.* A lectin synthesis in developing and germination wheat and rye embryos // Planta. – 1982. – V. 156, № 1. – P. 41-44.
- Peumans W.J., Van Damme E.J.M.* Lectins as plant defense proteins // Plant Physiol. – 1995. – V. 109. – P. 347-352.

Поступила в редакцию
24.05.2012 г.

LECTIN ACTIVITY AND EXPRESSION OF LECTIN GENES OF WHEAT SEEDLINGS AT THE INFECTION OF FUNGI PATHOGENS AND ACTION OF SALICYLIC ACID

O. O. Molodchenkova¹, V. G. Adamovskaya¹, V. Ye. Dosenko², P. S. Tikhonov³

¹*Plant Breeding and Genetic Institute – Center of Seed and Cultivar Investigation
of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
(Odesa, Ukraine)*

²*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

³*Odessa State Agrarian University
of Ministry of Agrarian Policy of Ukraine
(Odesa, Ukraine)*

Changes of the level of lectins' activity and mRNA for wheat varieties which differ in resistance to pathogens at the infecting of *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp.* and at the action of salicylic acid are established. It was concluded, that increase of lectins' activity and level of expression of lectins' genes is one of wheat plants defense reaction on the action of fungi pathogens and salicylic acid which has the peculiar features depending of varieties' resistance and impact factor.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp.*, lectin activity, lectins, expression of genes

ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

ЛЕКТИНОВА АКТИВНІСТЬ ТА ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ЛЕКТИНУ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ПРИ ІНФІКУВАННІ ГРИБНИМИ ПАТОГЕНАМИ ТА ДІЇ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ

О. О. Молодченкова¹, В. Г. Адамовська¹, В. Є. Досенко², П. С. Тихонов³

¹Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення
Національної академії аграрних наук України
(Одеса, Україна)

²Інститут фізіології ім. А.А. Богомольця
Національної академії наук України
(Київ, Україна)

³Одеський державний аграрний університет
(Одеса, Україна)

Встановлені відмінності рівня лектинової активності та вмісту мРНК лектинів у різних за стійкістю до патогенів сортів пшениці при інфікуванні *Fusarium graminearum*, *Alternaria* spp. і дії саліцилової кислоти. Зроблено висновок, що збільшення лектинової активності та рівня експресії генів лектину є однією із захисних реакцій рослинного організму пшениці на дію грибних патогенів і саліцилової кислоти, яка має свої особливості залежно від стійкості сорту і чинника впливу.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Fusarium graminearum*, *Alternaria* spp., лектинова активність, лектини, експресія генів