УДК [633.11:577.112]::[54.05:542+544.355-145.55]::001.82
Л. В. Чеботарьова
аспірант*
Полтавська державна аграрна академія
Рецензент – член редколегії «Вісник ЖНАЕУ» д.с.-г.н. Смаглій О. Ф.

МЕТОДОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИДІЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ (*TRITICUM AESTIVUM L.*)

Узагальнено дані про методи виділення та виявлення активності лектинів пшениці озимої. Запропонована модифікована методика виділення лектинів пшениці та виявлення їх активності за допомогою діапазону значень pH середовища. Доведено ефективність використання діапазону pH у межах 4,0–8,0 для оцінки активності лектинів в вегетативних та генеративних органах пшениці залежно від фази розвитку та у рослинах різних сортів. Це дозволяє отримати додаткові дані про роль і значення аглютиніну зародка пшениці у фізіолого-біохімічних процесах на рівні клітини і рослини, оцінити адаптивні реакції сортів на агроекологічні умови.

Постановка проблеми

Лектини – широко поширені в природі білки, відмінною особливістю яких є здатність зворотно і вибірково зв'язувати вуглеводи, не викликаючи їх хімічного перетворення [1, 11]. У злакових поширені лектини, що зв'язують N-ацетил-D-глюкозамін і хітинові олігосахариди, вони можуть бути або чистими білками (види роду Triticum L., Secale cereale L., Oryza sativa L.) або глікопротеїнами, де вміст вуглеводів до 30–50% (Sorghum bicolor (L.) Moench, Elytrigia repens (L.), Stipa capillata L.) [1]. Лектини пшениці хітиноспецифічні (активний центр найбільш комплементарний до хітотріози), можуть вміщувати у своїй структурі від двох до семи тандемно розміщених гевеїнових доменів (цистеїнові залишки з'єднані між собою дисульфідними містками) [21]. Така структура обумовлює широкий спектр функцій ендогенних і екзогенних лектинів, механізми яких сьогодні є актуальною темою дискусій. Лектини пшениці беруть участь у процесах ділення, розтягу, диференціювання клітин і підтримання гомеостазу [17]; виконують мітогенну і трансформаційну дію [12, 22, 23]; беруть участь у міжклітинному розпізнаванні та створенні контакту між клітинною стінкою і цитоскелетом [19, 23]; підтримують спокій в насінні, індукують його формування та дозрівання; залучені у транспорт, обмін, акумуляція вуглеводів та білків у рослині [9]; обумовлюють захист від хітиновмісних патогенів [17, 20]; здійснюють активацію захисних систем та формування відповіді на несприятливу дію абіотичних факторів середовища [6, 19, 21]. Видова специфічність лектиновмісних фракцій білків пшениці, за рахунок ідентичної або подібної послідовності амінокислот на різних ділянках молекули, засвідчує спільність їхнього походження й значну стабільність у ході еволюції і дає змогу

© Л. В. Чеботарьова
*Науковий керівник – к.с.-г.н., доцент Поспєлов С. В.

використовувати їх як маркери в селекційно-генетичних дослідженнях. З огляду на вищесказане, актуальним є виявлення та діагностування активності лектинів у рослині з метою з'ясування механізмів їх функціональної активності щодо можливості керування цими процесами щодо підвищення продуктивності пшениці озимої як головної продовольчої культури.

Аналіз останніх досліджень та постановка завдання

Пошук оригінальної методики виділення та визначення активності лектинів пшениці озимої, модифікованої до наших умов змусило детально вивчити дане питання в літературі. За даними різних дослідників лектини з зародків ячменю [3], пшениці [14] екстрагують 0,2 М NaCl у співвідношенні наважки до екстрагента 1:20 [3], або 0,9 %-ним розчином NaCl, водою або фосфатними чи ацетатними буферними розчинами (pH 6,0–7,8) [2, 15, 16]. Іноді екстракцію здійснюють розчином 0,1 н HCl [10], 0,05 н HC1 [7, 8, 18]. Деякі дослідники [4, 5, 20] вміст лектинів визначали в «грубому» рослинному екстракті, при цьому використовували рідкий азот, додаючи HCl. Екстракцію проводили протягом 2 [2, 3], 4 [6–8] або 24 годин [14, 18] за різних температур: -4°С, +4°С, +20–25°С [16, 18, 22]. Традиційно відцентрифугований екстракт нейтралізують лугами [9] або льодяною оцтовою кислотою [16], проводять фракціонування етанолом [18, 22] чи сульфатом амонію [16] або не концентрують лектини [2]. Для виявлення активності лектинів пшениці використовують реакцію аглютинації еритроцитів крові людини [14, 18, 20], кролів [16, 9], щурів [3]. Найбільш чутливими є еритроцити крові людини та кролів, особливо після трипсинізації. Лектинову активність розраховують по мінімальній кількості білка, яка викликає аглютинацію еритроцитів (мкг білка/мл)$^{-1}$ [11]. Результати оцінюють візуально, за характером осадження еритроцитів на дні лунки імунологічного планшета у фізіологічному розчині зі сталим значенням pH. Відомості про використання буферних систем в дослідженні гемаглютинації білків зернових культур відсутні в літературі.

Необхідність узагальнення описаних методологічних підходів обумовила ***мету та завдання даного дослідження*** – створення модифікованої методики виділення лектинів пшениці озимої та виявлення їх активності залежно від динамічного pH середовища.

Об'єкти та методика досліджень

Для визначення активності лектинів використовували повітряно-сухі зразки м'якої пшениці озимої (*Triticum aestivum L.*) сортів селекції Полтавської державної аграрної академії, відібрані з рослин на різних етапах онтогенезу

Виділення лектинів проводили шляхом кислотного гідролізу рослинних зразків та подальшого низькотемпературного етанольного фракціонування. Визначення активності лектинів проводили в діапазоні pH=4,0–8,0 за допомогою реакції гемаглютинації з еритроцитами I(0) групи крові людини [11]. Реакцію

здійснювали шляхом внесення в лунки імунологічного планшета 0,05 мл фосфатно-цитратного буфера у діапазоні pH=4,0–8,0 [13], наступного послідовного розведення лектинів, додаванням 0,05 мл 2 % суспензії еритроцитів і інкубації планшета протягом двох годин за температури 22–24^{0}С. Аглютинацію визначали візуально і оцінювали у балах, від нуля до трьох, залежно від характеру розподілу еритроцитів по дну лунки імунологічного планшета.

Результати досліджень

З метою оптимізації методики визначення лектинів пшениці озимої та визначення їх фізіологічної активності нами були проведені відповідні експерименти.

Пошук оптимального екстрагенту зумовили удосконалення загального процесу екстракції. Тому були проведені досліди з вивчення екстракції соляною кислотою без розведення фізіологічним розчином. Після закінчення часу експозиції екстракт фільтрували і нейтралізували лугом (NaOH) відповідної концентрації у співвідношенні 1:1. Температурні умови та час екстракції такі ж як у попередньому досліді. З таблиці 1 видно, що при екстракції зразків пшениці 0,05н HCl аглютинація відбувається з найвищими балами порівняно з іншими екстрагентами. Також було відмічено, що при концентрації 0,1н HCl у кислій зоні спостерігався лізис еритроцитів, що вказує на невідповідність умов аглютинації, що погіршує виявлення можливої активності лектинів.

Таблиця 1. **Активність лектинів пшениці озимої залежно від концентрації екстрагента**

Екстрагент	Сорт	pH визначення						
		4,0	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,6
		гемаглютинація, умов. бали						
0,1н HCl	Коломак 5	Л	5	3	0,5	0	0	0
	Косич	Л	4	4	0,5	0	0	0
0,05н HCl	Коломак 5	6	4,5	4	0,5	0,5	0	0
	Косич	5	3	3	0,5	0	0	0
0,01н HCl	Коломак 5	1,5	1,5	0,5	0	0	0	0
	Косич	1	1	0,5	0,5	0	0	0

*Л – лізис еритроцитів

Важливим фактором виділення лектинової фракції є тривалість екстракції. Під час досліджень ми виявили вплив тривалості екстрагування та концентрації соляної кислоти на процес виділення білків. З таблиці 2 видно, що найвищі бали активності лектинів мали зразки після 24 годин екстрагування при концентрації соляної кислоти 0,05 н. Була визначена тенденція до зниження активності лектинів при скороченні часу екстракції. При більш тривалому екстрагуванні розширювався діапазон активності відносно pH середовища, якщо за 2–4-

годинного екстрагування активність виявляється лише у лужній зоні, то за 20–30 годин – у всьому досліджуваному спектрі pH. Порівняльна характеристика двох кислотних екстрагентів показала, що при 0,1 н. HCl більше спостерігається руйнування еритроцитів у кислій зоні і, чим довше проходить екстракція, тим лізованих еритроцитів більше. Це обмежує можливість виявлення фізіологічної активності лектинів у широкому кислотно-лужному спектрі.

З даних таблиці 2 видно, що показники активності із збільшенням часу екстрагування від 20 до 30 годин мало чим відрізняються. Тому збільшувати час кислотного гідролізу немає необхідності. Таким чином оптимальний термін екстракції становив 20–24 години.

Таблиця 2. **Залежність активності лектинів від тривалості екстрагування та концентрації екстрагентів**

Час екстракції, год	Екстрагент	pH визначення								
		4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
		гемаглютинація, умов. бал								
2	0,1н HCl	Л	0	0	0	0	0	0	2	2
	0,05н HCl	0	0	0	0	0	0	1	1,5	1,5
4	0,1н HCl	Л	0	0	0	0	0	0	0	1,5
	0,05н HCl	0	0	0	0	0	0	1	2	2
16	0,1н HCl	Л	Л	0	0,5	2	2	2,5	3	4
	0,05н HCl	0	0	0,5	2	4	2	3,5	3,5	4
20	0,1н HCl	Л	Л	0	0,5	2	2	2	3	3,5
	0,05н HCl	0	0,5	0,5	1	3	3,5	5	5,5	6
24	0,1н HCl	Л	Л	0	0	3	3	4,5	5,5	5,5
	0,05н HCl	0	5,5	5,5	2,5	3	4	5	6	6,5
30	0,1н HCl	Л	Л	0	0	2	3	3	3,5	5,5
	0,05н HCl	Л	3,5	5,0	3	3	3	3	5,5	6,0

*Л – лізис еритроцитів

Нами також вивчався температурний режим екстракції. Для цього зразки екстрагували в умовах низьких від'ємних і позитивних температур (-4 – +4 °С) і при кімнатній температурі (+ 20–25 °С). Оптимальною виявилася температура в межах +20–25 °С, що підтверджується даними, наведеними в таблиці 3.

При визначенні активності лектинів важливим є максимальне очищення екстракту від баластних білків, наявність яких може суттєво впливати на якість перебігу гемаглютинації, а отже показувати хибні показники активності. Для очищення лектинової фракції та концентрації даних білків використовують різні сполуки, такі як: ацетон [1, 11], сульфат амонію [16], етанол [4, 7, 8, 20]. Найчастіше застосовують етанол, при чому концентрація спирту, як стверджують деякі автори, повинна бути не меншою ніж 66 % [4] або 96 % [20].

Таблиця 3. **Зміна активності лектинів залежно від температурного режиму екстрагування**

Сорт (фаза)	pH визначення								
	4,0	**4,5**	**5,0**	**5,5**	**6,0**	**6,5**	**7,0**	**7,5**	**8,0**
	-4 °С								
Коломак 5 (колосіння)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Сидір Ковпак (3 листка)	0,5	0,5	0	0	0	0,5	0,5	0,5	1,0
Соната (3 листка)	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5
	+4 °С								
Коломак 5 (колосіння)	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	3,0
Сидір Ковпак (3 листка)	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	2,0	3,0
Соната (3 листка)	1,0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	2,0
	+20–25° С								
Коломак 5 (колосіння)	0	0	0	0	1,0	2,0	4,0	6,0	10,5
Сидір Ковпак (7 днів)	0	12,0	9,0	10,0	9,0	9,0	8,5	8,5	6,5
Соната (12 днів)	0	5,5	5,0	1,0	0,0	1,0	5,0	5,0	6,0

Для нормального перебігу біохімічних перетворень у рідкій фракції рослинної клітини, важливим фактором є pH середовища. Підтримання відносно сталих значень pH у клітині забезпечується буферами і насосами, які перекачують іони H+ у вакуолю або з вакуолі. Так, у цитоплазмі pH=7; у вакуолі, за рахунок наявності органічних кислот pH вмісту зазвичай коливається в межах 3,5–5,5; між двома сторонами мембрани також існує різниця в значенні pH [1, 13]. Доведено, що лектини знаходяться у клітині як у розчиненому стані так і є компонентами клітинних мембран. Отже, їх функціональна активність може бути прямо залежною від змін pH як в середині клітини, так і у міжклітинному просторі. Також вбудовані у мембрани лектини беруть безпосередню участь у гомеостатичних процесах.

Традиційні методи виявлення активності лектинів засновані на проведенні реакції у фізіологічному розчині, що має значення pH=6,8–7,2. В результаті численних аналізів, проведених нами, було з'ясовано, що лектини пшениці часто не виявляють своєї активності при такому значенні pH. Таким чином можливість об'єктивно оцінювати за даним показником рослини пшениці на різних етапах розвитку і на сортовому рівні значно ускладнювалася. Саме тому нами було вирішено проводити визначення активності лектинів у діапазоні pH від 4,0 до 8,0. Так, з таблиці 4 видно, що у зернівках деяких сортів (Лютенька, Коломак 3) активність лектинів проявлялася лише у лужній зоні при pH=7,5–8,0. У сорту Вільшана при pH=7,0 активність рівна одиниці, проте спостерігається стрімке підвищення як у кислій зоні (при pH 4,5–5,0) так і у лужній (при pH=8,0). У половини досліджуваних сортів підвищення активності летинів спостерігалося у всьому діапазоні pH, навіть зі зростанням у десять разів для сорту Сагайдак при pH=8,0.

Таблиця 4. **Сортові особливості активності лектинів залежно від pH середовища**

Сорти	pH визначення								
	4,0	**4,5**	**5,0**	**5,5**	**6,0**	**6,5**	**7,0**	**7,5**	**8,0**
Вільшана	0,0	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,5	3,5
Говтва	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Кармелюк	0,0	3,0	3,5	5,0	4,5	5,0	5,0	5,5	5,0
Коломак 5	0,0	2,0	3,5	4,0	4,5	4,0	4,5	4,5	4,5
Лютенька	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	3,5
Сагайдак	0,0	4,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	5,0	10,5
Соната	0,5	2,5	1,5	1,5	1,5	2,5	2,5	2,5	3,0
Манжелія	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	1,5
Коломак 3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	2,0

Дослідження лектинової активності пшениці на різних етапах онтогенезу, а також у різних частинах рослини виявило значну залежність показника від значення pH. У таблиці 5 показана динаміка зміни активності лектинів. Так, з'ясовано, що молоді рослини у більшості випадків, виявляють високу активність у всьому досліджуваному діапазоні. У фазу кущіння активність виявляється стійко у лужній зоні, у фазу колосіння та повної стиглості може бути взагалі відсутня (у колосках, у соломі) або вона висока у всьому діапазоні pH (стебла та листки, полова).

Таблиця 5. **Динаміка активності лектинів пшениці в онтогенезі в умовах зміни pH середовища**

сорт Вільшана	**pH визначення**								
	4,0	**4,5**	**5,0**	**5,5**	**6,0**	**6,5**	**7,0**	**7,5**	**8,0**
зернівка	0,0	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,5	3,5
рослини віком: 3 доби	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5
7 діб	0,0	2,5	1,5	0,0	0,0	3,0	5,0	5,5	4,0
10 діб	0,0	13,5	9,5	8,0	5,5	5,0	8,0	8,0	3,5
12 діб	0,0	3,0	1,5	1,5	1,0	1,5	3,0	5,0	5,5
рослини у фазу кущення	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	5,5	4,0
рослини у фазу колосіння (стебла, листки)	0,0	0,5	0,5	2,5	5,5	8,0	7,0	3,0	6,5
рослини у фазу колосіння (колоски)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
рослини у фазу повної стиглості (солома)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
рослини у фазу повної стиглості (полова)	0,0	2,5	5,0	6,5	6,0	7,0	5,0	4,0	2,0

Отже, коливання значень активності летинів у пшениці озимої і підвищення їх у деяких випадках у 8–13,5 раза є підтвердженням доцільності виявлення даного фізіологічного показника у широкому спектрі pH, від 4,0 до 8,0, що розширює наше уявлення про роль і значення лектинів в онтогенезі рослин.

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. В результаті проведених досліджень була удосконалена методика визначення активності лектинів різних частин і органів пшениці озимої та обґрунтовані основні параметри для проведення масових аналізів.

2. Встановлено, що максимальна кількість білкових речовин видаляється при застосуванні 0,05 н HCl. При цьому зразки необхідно екстрагувати 20–24 години за температури +20–25 °С. У подальшому для концентрування білків застосовується низькотемпературне етанольне фракціонування до 40 % концентрації етанолу.

3. Доведено, що активність лектинів пшениці озимої суттєво змінюється залежно від pH середовища.

Розроблена методика може знайти застосування для оцінювання адаптивних властивостей сортів та селекційних зразків пшениці, визначення їх біохімічних реакцій в умовах абіотичного стресу. Це дозволить виявити морфологічні і фізіологічні маркерні ознаки рослин, пов'язані із активністю АЗП, і обумовить застосування їх у селекційному процесі.

Література

1. *Антонюк В. О.* Лектини та їх сировинні джерела. /*В. О. Антонюк*. – Львів: Кварт, 2005. – С. 108–124.

2. *Антонюк В. О.* Лектини у медико-біологічних та фітохімічних дослідженнях: сировинна база, отримання, властивості та аспекти практичного використання: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора фарм. наук: спец. 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія» / *В. О. Антонюк*. – Львів, 2007. – 37 с.

3. Биохимический метод оценки ярового ячменя на устойчивость к фузариозной и гельминтоспориозной инфекции / *В. Г. Адамовская, А. А. Личневский, О. О. Молодченкова* [та ін.] // Зб. наук. пр. СГІ. – Одеса, 2002. – вип. 2 (42): С. 83–88.

4. *Авальбаева А. М.* Множественная гормональная регуляция содержания лектина в корнях проростков пшеницы / *А. М. Авальбаева, М. В. Безрукова, Ф. М. Шакирова* // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 5. – С. 718–722.

5. Участие агглютинина зародыша пшеницы в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней проростков / *М. В. Безрукова, А. Р. Кильдибекова, А. М. Авальбаев Ф. М. Шакирова* // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 1. – С. 35–38.

6. Лектины клеточной стенки при закаливании к холоду озимой пшеницы / *Л. Д. Горяева, С. А. Поздеева, О. А. Тимофеева, Л. П. Хохлова* // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 6. – С. 845–850.

7. *Кириченко О. В.* Вплив екзогенного специфічного лектину на пектинову активність у проростках та листках пшениці / *О. В. Кириченко*, О. М. Тищенко // Укр. біохім. журнал. – 2005. – Т. 77, № 4. – С. 133–137.

8. *Кириченко О. В.* Вплив передпосівного оброблення насіння ярої пшениці аглютиніном пшеничних зародків на вміст хлорофілу і лектинову активність у листках та азотфіксувальну здатність ризосферних мікроорганізмів / *О. В. Кириченко* // Укр. біохім. журнал. – 2008. – Т. 80, № 1. – С. 107–113.

9. *Комарова Э .Н.* Активность лектинов внутриклеточного компартмента узла кущення озимой пшеницы при закаливании к морозу / *Э. Н. Комарова,* Т.И. Трунова // Вестн. Башкирского ун-та. – 2001. – № 2 (II). – С. 80–82.

10. *Коноплич Л. А.* О гемагглютинирующей активности лекарственных растений / *Л. А. Коноплич* // Физиология и биохимия культурных растений. – К.: ВИНИТИ, 1984. – 19 с.

11. *Луцик М. Д.* Лектины / *М. Д. Луцик, Е. Н. Панасюк, А. Д. Луцик.* // Львов: Вища школа, 1981. – С. 154.

12. *Марков Е. Ю.* Лектины растений: предполагаемые функции / *Е. Ю. Марков, Э. Е. Хавкин* // Физиология растений. – 1983. – Т. 30, № 5. – С. 852–857.

13. Методы биохимического исследования растений / под ред. доктора биол. наук. *А. И. Ермакова*. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.

14. *Молодченкова О. О.* Біохімічні механізми захисних реакцій злакових рослин за грибних інфекцій та інших несприятливих умов довкілля: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук: спец. 03.00.04 «Біохімія» / *О. О. Молодченкова*. – Одеса, 2013. – 41 с.

15. *Потапов М. И.* «Антитела» растительного происхождения и некоторые вопросы их исследования / *М. И. Потапов* // Успехи современной биологии. – 1963. – Т. 55, вип. 2. – С. 191–203

16. Плоидность разных видов пшеницы и лектиновая активность белков их семян / *Э. А. Рапава, Р. Г. Ахалкаци, Л. В. Кекенадзе* [и др.] // Сообщения Акад. наук Ґрузинской ССР. – 1988. – 129, № 1. – С. 161–163.

17. *Сытников Д. М.* Участие лектинов в физиологических процесах растений / Д.М. Сытников, *С. Я. Коць* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 4. – С. 279–296.

18. *Тимофеева О. А.* Лектины как активные компоненты адаптивных реакций озимой пшеницы к неблагоприятным условиям среды: дисс. … доктора биол. наук: спец. 03.00.12 «Физиология и биохимия растений». / *О. Ф. Тимофеева* – Уфа, 2009. – 287 с.

19. *Тимофеева О. А.* Лектины клеточной стенки в адаптивных реакціях озимой пшеницы / *О. А. Тимофеева, Ю. Ю. Невмержицкая, И. Г. Мифтахова* [и др.] // Растения и стресс: все рос. симпозіум: тезисы докл., 9–12 нояб. 2010, – М., 2010. – 419 С.

20. Изменение содержания лектина, абсцизовой и индолилуксусной кислотой в растениях пшеницы, инфицированных Septoria nodorum Berk /

Р. М. Хайруллин, Ф. М. Шакирова, И. В. Максимов [и др.]. // Физиология и биохимия культурных растений. – 1993. – Т. 25. – № 2. – С. 134–144.

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

22. *Шакирова Ф. М.* Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений / *Ф. М. Шакирова, М. В. Безрукова* // Журнал общей биологии. – 2007. – Т. 68. – С. 98–114.

23. *Ямалеева А. А.* Лектины растений и их биологическая роль. / *А. А. Ямалеева* – Уфа: Изд-во Башкір. ун-та, 2001. – 204 с.