

16. Ermakova I. M. Krovohlebka lekarstvennaja (Sanguisorba officinalis) / I. M. Ermakova // Diagnosty i kljuchi vozrastnyh sostojanij lugovyh rastenij. – M., 1976. – S. 47-51.
17. Zhukova L. A. Ontogenez krovohlebki lekarstvennoj (Sanguisorba officinalis) / L. A. Zhukova // Ontogeneticheskij atlas lekarstvennyh rastenij. – Joshkar-Ola : MarGU, 1997. – S. 160-167.
18. Hozhajnova N. V. Morfologo-biologicheskie osobennosti Sanguisorba officinalis: avtoref. dis. na zdobuttja nauk. stupenja kand. biol. nauk : spec. 03.00.05 «Botanika» / N. V. Hozhajnova M., – 1989. – 20 s.
19. Kriterii vydelenija vozrastnyh sostojanij i osobennosti hoda ontogeneza u rastenij razlichnyh biomorf / [Smirnova O.V., Zaugol'nova L. B., Toropova H. A. i dr.] // Cenopopuljacija rastenij. – M., 1976. – S. 14 – 43.
20. Polevaja geobotanika: v 4 t. – M. – L., 1964. – T. 3. – 530 s.
21. Metody polevogo izuchenija lekarstvennyh rastenij. – Saratov: izdatel'skij centr «Nauka», 2007. – 27 s.
22. Zhivotovskij L. A. Ontogeneticheskie sostojanija, jeffektivnaja plotnost' i klassifikacija populjacij rastenij / L.A. Zhivotovskij // Jekologija. – 2001. – № 1. – S. 3–7.
23. Zlobin Ju. A. Populjacija redkih vidov rastenij: teoreticheskie osnovy i metodika izuchenija : monografija / Ju. A. Zlobin, V.G. Skljar, A.A. Klimenko. – Sumy : Universitetskaja kniga, 2013. – 439 s.
24. Bondareva L. M. Populjacija cenozoutvorjajuchih vidiv zlakovyh roslin na zaplavnih lukah r. Suli v ii verhnij ta serednij techii (Sums'ka oblast'): avtoref. dis. na zdobuttja nauk. stupenja kand. biol. nauk : spec. 03.00.05 «Botanika» / L. M. Bondareva. – K., – 2005. – 20 s.
25. Zaugol'nova L. B. Tipy vozrastnyh spektrov normal'nyh cenopopuljacij rastenij / L. B. Zaugol'nova // Cenopopuljacija rastenij (osnovnye ponjatija i struktura). – M., 1976. – S. 81 – 92.

УДК 582.751.4:54-145.53:591.133.12

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕКТИНОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК АНДРОЦЕЯ И ГИНЕЦЕЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *LINUM L.*

Левчук А.Н.

*Запорожский национальный университет,
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

anna.levchuck@yandex.ua

Исследовали уровень биологической активности лектинов, локализованных в различных частях андроцея и гинецея 3-х гетеростильных и 3-х гомостильных видов льна. Выявлены различия в уровне лектиновой активности и углеводной специфичности между гомо- и гетеростильными видами, а также длинно- и короткостолбчиковыми формами цветков гетеростильных видов. Установлено, что в андроцее и гинецее гомостильных видов присутствуют менее активные лектины по сравнению с гетеростильными видами, а короткостолбчиковые формы цветков последних характеризуются более высоким уровнем лектиновой активности по сравнению с длинностолбчиковыми. Выявлено, что наиболее активными являются лектины пыльника и рыльца, а наименее активными – лектины завязи. Обнаружено, что лектины разных частей андроцея и гинецея одного вида имеют одинаковую углеводную специфичность. Все лектины являются маннозоспецифичными, а белки гомостильных видов и длинностолбчиковые формы гетеростильных – способны ещё распознавать галактозу.

Ключевые слова: лён (*Linum L.*), гетеростилья, лектиновая активность, углеводная специфичность, андроцей, гинецей.

Левчук А.Н. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЛЕКТИНІВ КЛІТИННИХ СТІНОК АНДРОЦЕЯ ТА ГІНЕЦЕЯ РІЗНИХ ВІДІВ РОДУ *LINUM L.* / Запорізький національний університет; 69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

Досліджували рівень активності і вуглеводну специфічність лектинів, локалізованих у різних частинах андроцею і гинецею 3-х гетеростильних і 3-х гомостильних видів льону. Виявлено відмінності за рівнем лектинової активності та вуглеводної специфічності між гомо- та гетеростильними видами, а також довго- та короткостовпчиковими формами квіток у гетеростильних видів. Встановлено, що в генеративних органах гомостильних видів присутні

менш активні лектини порівняно з гетеростильними видами, а короткостовпчикові форми квіток характеризуються більш високим рівнем лектинової активності порівняно з довгостовпчиковими. Виявлено, що найбільш активними є лектини пиляка і приймочки, а найменш активними – лектини зав'язі. Виявлено, що лектини різних частин андроцею і гінецею одного виду мають однакову вуглеводну специфічність. Усі лектини є манозоспецифічними, а білки гомостильних видів і довгостовпчикових форм гетеростильних – здатні ще розпізнавати галактозу.

Ключові слова: льон (*Linum L.*), гетеростилья, лектинова активність, вуглеводна специфічність, андроцей, гінецей.

Levchuk H.M. BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANDROECIUM AND GYNOECIUM CELL WALL LECTINS OF DIFFERENT SPECIES OF GENUS *LINUM L.* / Zaporizhzhya National University; 69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

One of the natural adaptations to the cross-pollination is heterostyly - the presence in one population different flower morphs - plants with different level of pistils and stamens in flowers. The seeds are formed only after pollination between different floral morphs. For example, pollen of short-styled floral morph can growth only in stigmas of long-styled floral morphs. This phenomenon is called self-incompatibility. *Linum* genus includes more than 200 species, among which there are representatives of both types of annual and perennial. The species of this genus are distributed around the world. The genus *Linum L.* are presented as tree and shrub forms, and herbaceous plants. The last group most common and presents annual and perennial species. It was found that a direct part in the process of pollination and pollen recognition by stigma take lectins - proteins or glycoproteins, capable of recognizing and reversibly binding cell surface carbohydrates. After contact with the pollen grains on the stigma goes double recognition process: between lectins of the pollen grains and carbohydrates sugary secretions of the stigma, and also between stigma lectins and carbohydrates cell surface of the pollen grain. In the investigation about 100 species of flowering plants, pistils, anthers and pollen of many of these proteins exhibiting hemagglutinin activity were detected. Based on the above, it can be assumed that the level of physiological and biochemical processes of pollination and fertilization in self-pollinated and in cross-pollinated plants are controlled by pistil and stamen lectins. The aim of this study was to establish the level of biological activity of the lectin proteins of different parts pistils and stamens in homostyled and heterostyled *Linum* species.

The object of the study were androecium and gynoecium of three homostyled (*L. angustifolium L.*, *L. bienne L.* and *L. usitatissimum L.*) and three heterostyled (*L. perenne L.*, *L. austriacum* and *L. thracicum*) *Linum* species. In heterostyled species were separately analyzed the flowers of long-styled and short-styled floral morphs. Lectins extracted with potassium phosphate buffer (pH 6.8). To separate the cell walls of the resulting slurry was squeezed through two layers of linen fabric. For extraction of cell wall lectins the obtained mass was homogenized with potassium phosphate buffer supplemented with 0.9% sodium chloride (pH 4.0), the resulting suspension was centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at these supernatant lectins contained cell walls. Lectins from the resulting solution was concentrated by salting out proteins using 70% ammonium sulphate and purified by precipitation at 60% saturation with acetone.

Lectin activity was measured using hemagglutinin assay with a 2% suspension of rabbit erythrocytes given protein concentration. Protein concentration was determined by the protocol of Warburg-Christian. In the analysis of lectin activity (LA) (g/ml) was expressed as the specific activity of lectin is agglutination titer ratio to the amount of protein. Carbohydrate specificity were determined by hemagglutinin inhibition reaction of the individual carbohydrates. The studies were conducted in the five-fold replicates. The results were processed using standard statistical methods.

The studies revealed that androecium and gynoecium in heterostyled species characterized by a higher level of lectin activity compared with homostyled species. In addition, in heterostyled species was found dependent the lectin activity from the type of a flower. In short-styled floral morphs the lectin activity an average of 3-30 times higher than that in long-styled floral morphs. Among the studied genotypes the largest difference on the level of lectin activity in pistils and stamens between short-styled and long-styled floral morphs were characterized of *L. thracicum*, which these differences range from 27 to 160 times. The smallest variation in lectin activity was found in *L. austriacum* (from 2.19 to 3.71 times). Level range of lectin activity in the androecium and gynoecium of long- and short-styled floral morphs in *L. perenne* flowers was 3 - 8 times. If comparing the homostyled species it should be noted that the generative organs species of *L. angustifolium* characterized the lowest activity of lectins, and *L. usitatissimum* lectin had the greatest activity among investigated homostyled species.

It is found that independent of the species and floral morphs the most active were stigmas lectin and, in some cases, the same activity had anther lectins (*L. bienne*, *L. usitatissimum*). The lowest lectin activity had filaments (*L. angustifolium*, long-styled flowers of *L. austriacum* and *L. perenne*) or ovaries (both

morphs of *L. thracicum* and short-styled flowers of *L. perenne*). In general, the activity of lectins in the androecium was slightly lower than in the gynoecium. After analyzing the lectin activity of androecium it was found that in all cases were more active lectins from anthers compared to these lectins from filaments. The level of these changes depended on the genotype, and ranged from 20% for *L. bienne*, *L. usitatissimum* and up to 4 times for flowers *L. perenne* and *L. angustifolium*. The difference in the level of lectin activity of anthers and filaments for *L. austriacum* were 2-4 times, and for *L. thracicum* were 2-2,5 times.

In comparing the level of lectin activity in gynoecium it was found that most lectin activity, independently of genotype had a stigma, and the least lectin activity had an ovary. However, changes in the level of lectin activity within the pistils were dependent on genotype and shape of the flower. Due to the fact that the lectin proteins are biologically active substances, which implement their activity by binding to certain carbohydrates, their biological activity is characterized not only by quantitative indicators - lectin activity, but also on quality indicators - carbohydrate specificity – a set of carbohydrates, which can recognize the lectin protein. In the analysis of the carbohydrate specificity it was found that lectins isolated from different parts of androecium and gynoecium have the same spectrum of carbohydrate specificity. It was revealed that the lectins of all studied species show ability of binding of mannose. It was detected as dependent on the type of carbohydrate specificity of the structure of the flower (homostyled or heterostyled). Lectins of homostyled species recognize and bind lactose and galactose, and lectins of heterostyled species were recognized and bind xylose.

As a result of investigations it was found that the androecium and gynoecium of heterostyled *Linum* species are characterized by a higher lectin activity than homostyled species. Lectins of homostyled species have a slight degree of lectin activity. These data were confirmed in studies by other authors, which found that the activity of lectins in pistils and stamens in cross-pollinated plants is much higher than that of these lectins of the self-pollinated plants. In some self-pollinated plants the lectin activity in pistils and stamens was not found.

In addition, within each of heterostyled species was found a difference in the level of lectin activity in generative structures of flowers between different floral morphs in favor of short-styled floral morph. Thus, the pistils and stamens of homostyled species have a lectin activity level much closer to pistils and stamens of long-styled floral morph of heterostyled species. It is interesting to note that a similar pattern was found for the surface of the exine of pollen grains in heterostyled perennial *Linum* species. Also, similar results were obtained when the level of activity of lectins of heterostyled species of *Primula obconica*. It was found that higher activity has lectins of short-styled flowers.

As a result of this study it was also found that irrespective of the floral morph and *Linum* species the hemagglutinin activity of lectins in gynoecium was significantly higher than this trait in androecium. We have found that the spectrum of the carbohydrate specificity of lectin in all investigated parts of androecium and gynoecium within the same species or forms (for heterostyled species) are identical. It is also known that in one organ may be multiple isoforms of lectins but in this case they are different from the spectrum of the carbohydrate specificity. Given the above, we assume that the pistils and stamens of homostyled and heterostyled *Linum* species circulate the same lectin protein.

Thus, these results confirm that there is a relationship between the type of flower structure (homostyled or heterostyled species) and the biological activity of lectin in pistils and stamens. This suggests the possibility of participation of lectins of these parts of flower in the process of regulation of pollination in heterostyled *Linum* species.

Key words: flax (*Linum* L.), heterostyly, activity of lectin-like proteins, carbohydrate specificity, androecium, gynoecium.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из естественных приспособлений к перекрёстному опылению является наличие гетеростилии – разностолбчатости у разных экземпляров растений одного вида. При этом свободное опыление происходит только у разностолбчатых форм. Например, рыльца длинностолбчатых цветков распознают и дают прорасти пыльце короткостолбчатых [1]. Такое явление называют самонесовместимостью.

Род *Linum* (Лён) включает в себя более 200 видов, среди которых есть представители как однолетних видов, так и многолетних. Виды этого рода распространены по всему земному шару. Род *Linum* L. представлен как древесными и кустарниковыми формами, так и травянистыми растениями [2, 3]. Последние наиболее распространены и представлены однолетними и многолетними видами.

Особого внимания при этом заслуживают многолетние виды данного рода, многим из которых свойственна диморфная гетеростилия [3, 4]. Впервые она была замечена у льна многолетнего (*L. perenne*). Было доказано, что гетеростильные виды льна характеризуются самонесовместимостью – оплодотворение происходит при попадании на рыльце длинностолбчатого цветка пыльцы короткостолбчатого и, наоборот. При попадании на рыльце пыльцы одноименного цветка оплодотворение чаще не происходит, либо же результаты скрещивания являются ненормальными и устраняются в ходе естественного отбора [5].

Установлено, что непосредственное участие в процессе опыления и распознавания пыльцы пестиком принимают лектины – белки или гликопротеины, способные распознавать и обратимо связывать углеводы клеточных поверхностей. При попадании пыльцевого зерна на рыльце происходит процесс двойного распознавания: между лектинами пыльцевого зерна и углеводами сахаристых выделений рыльца, а также между лектинами рыльца и углеводами клеточных поверхностей пыльцевого зерна [6]. Обнаружено, что главную роль в реакциях распознавания со стороны мужского гаметофита при внутри- и межвидовых скрещиваниях играют белки (антигены) пыльцы, которые быстро высвобождаются из клеточной стенки пыльцевого зерна при прорастании. Впоследствии было доказано, что эти небольшие протеиновые молекулы, которые имеют очень высокую биологическую активность и проявляют ее при очень низких концентрациях, – и есть лектины [7, 8]. Установлено повышение лектиновой активности пестиков петунии при совместном опылении, а также ее снижение при несовместимом опылении [8]. Кроме того, при исследовании около 100 видов цветковых растений в пестиках, пыльниках и пыльце многих из них были обнаружены белки, проявляющие гемагглютинирующую активность. Исключение составили лишь некоторые самоопыляющиеся растения [9]. Многими исследователями было выявлено стимулирующее действие лектинов на прорастание пыльцы и интенсивность роста пыльцевых трубок как в условиях *in vitro* [10], так и в условиях *in vivo* [11].

Основываясь на вышеизложенном, можно предположить, что на физиолого-биохимическом уровне процессы опыления и оплодотворения у само- и перекрёстно-опыляемых растений контролируются лектинами генеративных органов.

Целью исследования было установить уровень биологической активности лектиноподобных белков разных частей генеративных органов гомостильных и гетеростильных видов льна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были три гомостильных (*L. Angustifolium* L., *L. Bienne* L. и *L. usitatissimum* L. и три гетеростильных (*L. perenne*, *L. austriacum* и *L. thracicum*) вида льна. У гетеростильных видов отдельно анализировали длинно- и короткостолбчатые формы цветков.

Исследования проводились на опытном участке кафедры садово-паркового хозяйства и генетики растений Запорожского национального университета. Сбор цветков проводился в период их раскрытия утром (в 8-9 часов). В лабораторных условиях из цветков осторожно удаляли лепестки и чашелистики, оставляя лишь генеративную часть. В каждом варианте использовали по 20-30 цветков. В дальнейшем, с помощью пинцета генеративную часть цветка разделяли отдельно на андроцей и гинецей. Из андроцея отдельно выделяли пыльники и тычиночные нити, а из гинецея – рыльца, столбики и завязи. Из этих частей отдельно экстрагировали растворимые лектиноподобные белки, используя разработанную нами методику [12].

Навеску растительного материала (0,05 г) гомогенизировали с 8 мл калий-фосфатного буферного раствора (рН 6,8). Для отделения клеточных стенок отжимали полученную суспензию через два слоя льняной ткани. Для извлечения лектинов из клеточных стенок полученную массу гомогенизировали с 5 мл калий-фосфатного буфера с добавлением 0,9% хлорида натрия (рН 4,0), полученную суспензию центрифугировали при 10 000 г в течение 15 минут: супернантант при этом содержал лектины клеточных стенок. Из полученного раствора лектиноподобные белки концентрировали путём высаливания 70% сульфатом аммония, а осадок разводили в 0,4 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Полученный раствор лектиноподобных белков дополнительно очищали путём осаждения при 60% насыщении ацетона (2 части ацетона на 1 часть раствора лектина). Лектины являются устойчивыми к такой высокой концентрации ацетона, и при растворении осадка в физиологическом растворе восстанавливают свою исходную структуру. Остальные белки при такой концентрации окончательно денатурируют [13].

Активность лектинов определяли с помощью реакции гемагглютинации с 2% суспензией эритроцитов кролика с учетом концентрации белка [14]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по методу Варбурга-Кристиана [15]. При анализе лектиновую активность (ЛА) (мкг/мл) выражали как удельную лектиновую активность – отношение титра агглютинации к количеству белка. Углеводную специфичность определяли с помощью реакции угнетения гемагглютинации отдельными углеводами [13]. Исследования проводились в пятикратной повторности, результаты обрабатывались с помощью стандартных статистических методов [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований выявлено, что андроцей и гинецей гетеростильных видов характеризовались более высоким уровнем лектиновой активности по сравнению с гомостильными видами (табл. 1).

Так, для гомостильных видов уровень гемагглютинирующей активности лектиноподобных белков генеративных органов колебался от 0,03 единиц активности в тычиночных нитях *L. angustifolium* до 2,36 единиц активности в рыльцах *L. usitatissimum*. У гетеростильных видов этот показатель варьировал от 4,11 единиц активности в завязях длинностолбчатых цветков *L. thracicum* до 18100,06 единиц активности в рыльцах короткостолбчатых цветков того же вида.

Таблица 1 – Удельная лектиновая активность растворимых лектиноподобных белков генеративных органов льна

№ п/п	Вид льна	Форма цветка	Орган выделения				
			андроцей		гинецей		
			пыльник	тыч. нить	рыльце	столбик	завязь
ГОМОСТИЛЬНЫЕ ВИДЫ							
1.	<i>L. angustifolium</i>	Гомостильные	0,13± 0,008	0,03 ± 0,002 ^{###}	0,26± 0,038	0,11± 0,007 ^{&&&}	0,06± 0,004 ^{&&&}
2.	<i>L. bienne</i>		1,60± 0,116	1,13± 0,063 [#]	1,98± 0,058	0,40± 0,020 ^{&&&}	0,22± 0,050 ^{&&&}
3.	<i>L. usitatissimum</i>		1,86± 0,373	1,37± 0,115 [#]	2,36± 0,245	0,46± 0,058 ^{&&&}	0,32± 0,072 ^{&&&}

Продолжение таблицы 1

гетеростильные виды							
4.	<i>L. perenne</i>	КС	98,83± 17,036	25,47± 1,612 ^{###}	123,48± 3,986	73,99± 2,893 ^{&}	40,52± 1,016 ^{&&&}
5.		ДС	11,27± 0,829 ^{***}	5,45± 0,102 ^{***, ###}	35,66± 3,869 ^{***}	20,20± 0,216 ^{**, &&}	10,07± 0,102 ^{**, &&&}
6.	<i>L. austriacum</i>	КС	130,84± 19,278	104,68± 9,028 ^{##}	606,76± 56,33	331,59± 43,601 ^{&}	256,86± 4,349 ^{&&}
7.		ДС	51,52± 1,098 ^{***}	27,89± 0,849 ^{***, #}	277,49± 16,215 ^{***}	96,25± 7,610 ^{***, &}	80,97± 0,357 ^{***, &&&}
8.	<i>L. thracicum</i>	КС	7418,10± 621,772	3893,55± 168,08 [#]	18100,06± 1312,771	1653,06± 290,754 ^{&&&}	640,88± 53,473 ^{&&&}
9.		ДС	224,52± 15,898 ^{***}	25,70± 0,888 ^{***, ###}	659,95± 524,833 ^{***}	27,16± 3,108 ^{***, &&&}	4,11± 0,299 ^{***, &&&}

Примечание: #, ##, ### – отличия от пыльца существенны при $P \leq 0,05$, $0,01$ и $0,001$ соответственно; &&&, &&, & – отличия от рыльца существенны при $P \leq 0,05$, $0,01$ и $0,001$ соответственно; *, **, *** – отличия между коротко- и длинностолбчиковыми формами цветков у гетеростильных видов существенны при $P \leq 0,05$, $0,01$ и $0,001$ соответственно.

Кроме того, у гетеростильных видов наблюдалась зависимость лектиновой активности от формы цветка. У короткостолбчиковых форм она, в среднем, в 3-30 раз выше, чем у длинностолбчиковых. Например, у *L. perenne* активность лектиноподобных белков пыльника длинностолбчиковых цветков более чем в семь раз ниже по сравнению с короткостолбчиковыми цветками, приблизительно в 2,5 раза – у *L. austriacum* и более чем в 33 раза – у *L. thracicum*. Подобная закономерность наблюдалась во всех частях генеративных органов, однако наибольшие различия по уровню лектиновой активности между длинно- и короткостолбчиковыми цветками наблюдались в тычиночных нитях и столбиках – до 155 и 160 раз соответственно.

Среди исследуемых генотипов наибольшим различием по уровню лектиновой активности в генеративных органах длинно- и короткостолбчиковых цветков характеризовался вид *L. thracicum*, у которого эти различия колеблются от 27 до 160 раз. Наименьшие варьирования лектиновой активности имел вид *L. austriacum* (от 2,19 до 3,71 раз). Диапазон изменения уровня лектиновой активности в андроеце и гинецеце длинно- и короткостолбчиковых цветков вида *L. perenne* составлял 3-8 раз.

При сравнении гомостильных видов следует отметить, что генеративные органы вида *L. angustifolium* характеризовались самой низкой активностью лектинов, а *L. usitatissimum* имели наибольшие показатели лектиновой активности среди исследуемых гомостильных видов (табл. 1).

Обнаружено, что независимо от вида и формы цветка наибольшей активностью обладали лектины рыльца, а в некоторых случаях такую же активность имели и лектины пыльника (*L. bienne*, *L. usitatissimum*). Наименьшую активность при этом имели лектины тычиночной нити (*L. angustifolium*, *L. austriacum* и длинностолбчиковые цветки *L. perenne*) или завязи (обе формы цветков *L. thracicum* и короткостолбчиковые цветки *L. perenne*).

В целом активность лектиноподобных белков в андроеце оказалась несколько ниже, чем в гинецеце. При анализе активности лектинов андроеца было выявлено, что во всех вариантах более активными оказались лектины пыльников по сравнению с этими белками тычиночных нитей (рис. 1). Уровень этих изменений зависел от генотипа и составил от 20% для *L. bienne* и *L. usitatissimum* до 4 раз для цветков *L. perenne* и *L. angustifolium*.

Разница в уровне лектиновой активности пыльников и тычиночных нитей для *L. austriacum* составила 2-4 раза, а для *L. thracicum* – 2-2,5 раза.

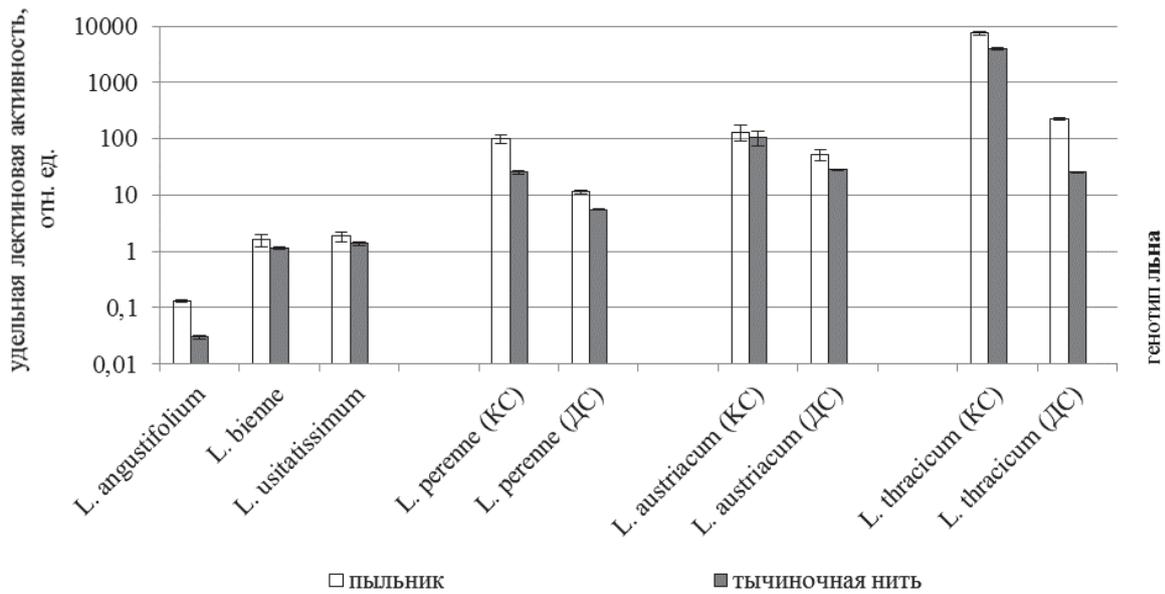


Рис. 1. Удельная лектиновая активность лектиноподобных белков, выделенных из частей андроеца различных видов льна

При сравнении уровня активности лектинов в пределах гинецея было выявлено, что наибольшей лектиновой активностью вне зависимости от генотипа обладали рыльца, а наименьшей – завязи (рис. 2).

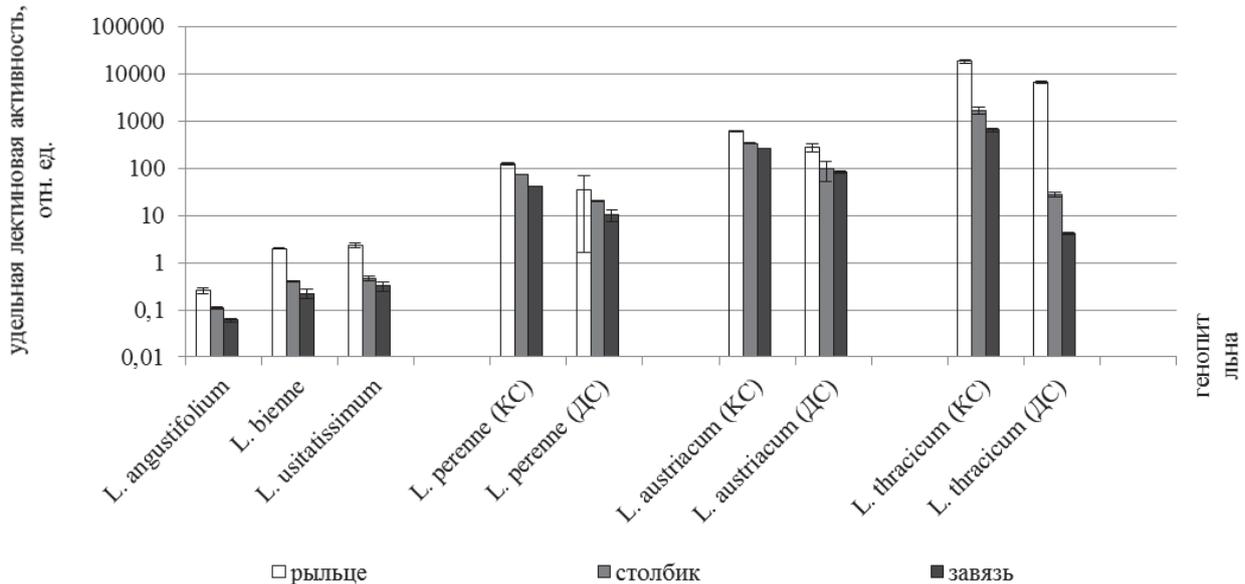


Рис. 2. Удельная лектиновая активность лектиноподобных белков, выделенных из частей гинецея различных видов льна

Однако уровень изменений лектиновой активности в пределах пестика зависел от генотипа и формы цветка. Так, у гомостильных видов *L. angustifolium* и *L. perenne* уровень активности лектинов при транспорте по пути «рыльце-столбик-завязь» на каждом этапе уменьшалось в 2 раза, т.е. активность лектинов столбика составила 50% от активности этих белков в рыльце. Активность лектинов в завязи была в два раза меньше, чем в

столбике. У *L. usitatissimum* и *L. bienne* активность лектинов при переходе из рыльца в столбик уменьшается резко – в 5 раз, а при переходе в завязь – ещё в 2 раза. в рыльце и в столбике одинакова, а в завязи она снижалась в 2 раза (рис. 2).

У гетеростильных видов наблюдаются более существенные изменения лектиновой активности в пределах гинецея – от 5 до 30 раз, но в большинстве случаев наиболее существенное снижение активности наблюдалось при переходе от рыльца к столбику – в 3-20 раз. Так, у гинецея *L. perenne* они составили порядка 3 раз, у *L. austriacum* – чуть больше 2 раз, а у *L. thracicum* – от 30 до 100 раз.

В связи с тем, что лектины являются биологически активными веществами, которые реализуют свою активность через связывание с определёнными углеводами, их характеризуют не только по количественному показателю – лектиновой активности, но и по качественному – углеводной специфичности – набору углеводов, которые может распознавать данный лектин [14].

При анализе углеводной специфичности обнаружено, что лектины, выделенные из разных частей андроеца и гинецея, обладают одинаковым спектром углеводной специфичности.

Выявлено, что лектины всех исследуемых видов проявляли способность связывать маннозу. Обнаружена также зависимость углеводной специфичности от типа строения цветка (гомо- или гетеростильные). Лектины гомостильных видов распознавали и связывали лактозу и галактозу, а гетеростильных – ксилозу (табл. 2).

Обнаружены также различия в спектре углеводной специфичности у коротко- и длинностолбчиковых цветков гетеростильных видов, короткостолбчиковые цветки которых в отличие от длинностолбчиковых проявляют способность связывать галактозу (табл. 2).

Кроме того, спектр углеводной специфичности лектинов андроеца и гинецея зависели и от видовой принадлежности и не зависели от формы цветков (для гетеростильных видов). Так, у *L. angustifolium* и *L. perenne* наблюдается способность распознавать глюкозу, у *L. bienne*, *L. usitatissimum* и *L. perenne* – арабинозу, а у *L. angustifolium* и *L. austriacum* – глюкозамин (табл. 2).

Таблица 2 – Углеводная специфичность растворимых лектиноподобных белков генеративных органов льна

№ п/п	Вид льна	Форма цветка	Углеводы									
			гал	глю	ман	кси	ара	сах	лакт	гл А		
ГОМОСТИЛЬНЫЕ ВИДЫ												
1.	<i>L. angustifolium</i>	Гомостильные	+	+	+					+	+	
2.	<i>L. bienne</i>		+		+		+				+	
3.	<i>L. usitatissimum</i>		+		+		+				+	
ГЕТЕРОСТИЛЬНЫЕ ВИДЫ												
4.	<i>L. perenne</i>	КС		+	+	+	+					
5.		ДС	+	+	+	+	+					
6.	<i>L. austriacum</i>	КС			+	+					+	
7.		ДС	+		+	+					+	
8.	<i>L. thracicum</i>	КС			+	+						
9.		ДС	+		+	+						

Примечание: «+» – угнетение реакции гемагглютинации данным углеводом.

Для тестирования углеводной специфичности были использованы растворы следующих углеводов в концентрации 0,6 М:

гал – галактоза;	ара – арабиноза;
глю – глюкоза;	сах – сахароза;
ман – манноза;	лакт – лактоза;
кси – ксилоза;	гл А – глюкозамин

В результате проведённых исследований выявлено, что андроцей и гинецей гетеростильных видов льна характеризуются более высокой лектиновой активностью, чем у гомостильных видов. Последние при этом имеют незначительный уровень лектиновой активности. Эти данные нашли подтверждение в исследованиях других авторов [9, 17], которыми было установлено, что активность лектинов генеративных органов у перекрёстно-опыляемых растений намного выше, чем у самоопыляемых. У некоторых самоопыляемых растений лектиновой активности в генеративных органах вообще обнаружено не было.

Кроме того, в пределах каждого из гетеростильных видов была обнаружена разница в уровне лектиновой активности генеративных структур между разными формами цветка в пользу короткостолбчиковых. Таким образом, по уровню лектиновой активности к гомостильным видам намного ближе генеративные органы длинностолбчиковых цветков гетеростильных видов. Интересно отметить, что аналогичная закономерность была обнаружена для поверхности экзины пыльцевых зёрен многолетних гетеростильных видов льна. По этому признаку пыльцевые зёрна последних различаются у разных форм цветков этих видов, причём у короткостолбчиковых цветков этот показатель не отличается от гомостильных видов [5]. Также аналогичные данные были получены при исследовании уровня активности лектинов гетеростильного вида *Primula obconica* [17] где было выявлено, что более высокой активностью обладают лектины короткостолбчиковых цветков.

В результате данного исследования было также обнаружено, что независимо от вида льна и формы цветка гемагглютинирующая активность лектиноподобных белков в гинецее значительно выше, чем в андроеце. Аналогичные результаты были получены на растениях петунии и лука [8].

Нами выявлено, что по спектру углеводной специфичности лектиноподобные белки всех исследуемых частей андроеца и гинецея в пределах одного вида или формы (для гетеростильных видов) являются идентичными. Известно также, что в одном органе могут присутствовать несколько изоформ лектинов, однако в этом случае они различаются по спектру углеводной специфичности [14]. Учитывая вышесказанное, мы предполагаем, что по генеративным органам гомо- и гетеростильных видов льна циркулирует один и тот же лектиноподобный белок.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что существует зависимость между типом строения цветка (гомо- или гетеростильный вид) и биологической активностью лектиноподобных белков генеративных органов. Это предполагает возможность участия лектинов генеративных органов в процессах регуляции опыления у гетеростильных видов льна.

В дальнейшем планируется изучение физиологической роли лектинов в регуляции процессов опыления и оплодотворения у гетеростильных видов льна, что позволит разработать методики преодоления самонесовместимости при самоопылении у этих видов и даст возможность выяснить физиологическую основу механизма несовместимости при межвидовой гибридизации.

ВЫВОДЫ

1. Во всех частях генеративных органов гетеростильных видов льна по сравнению с гомостильными выявлена более высокая лектиновая активность. При этом наибольшей активностью обладали рыльца по сравнению со столбиками, завязями, пыльниками и тычиночными нитями.
2. Выявлена существенная разница по уровню лектиновой активности между коротко- и длинностолбчиковыми цветками гетеростильных видов в пользу первых.
3. Установлено, что лектиноподобные белки всех частей андроеца и гинецея в пределах одного вида характеризуются одинаковым спектром углеводной специфичности.
4. Показано, что лектиноподобные белки гомо- и гетеростильных видов льна проявляют способность связывать маннозу, гомостильных и длинностолбчиковых цветков гетеростильных – галактозу, гомостильных – лактозу, а гетеростильных – ксилозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pandey A. K. Structure, development and reproduction in flowering plants: flower, sexual and vegetative reproduction, and significance of seed / A. K. Pandey // Bhagalpur : TM Bhagalpur University, 2006. – P. 18-23.
2. Лях В. А. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* L. и биотехнологические пути работы с ними: монография / Лях В. А., Сорока А. И. – Запорожье : Запорожский национальный университет, 2008. – 182 с.
3. Оптасюк О. М. Рід *Linum* L. у флорі України / Оптасюк О. М., Шевера М. В. – К. : Альтерпрес, 2011. – 276 с.
4. Синская Е. Н. Биология развития и физиологии льна / Синская Е. Н. – М. : Агропромиздат, 1988. – 147 с.
5. Жизнь растений: в 6-ти т. / [под ред. А. Л. Тахтаджяна, гл. ред. чл.-кор. АН СССР, проф. А. А. Федоров]. — М. : Просвещение, 1974. –Т. 5.2. – С. 270-274.
6. Линевиц Л. И. Лектины и углевод-белковое узнавание на разных уровнях организации живого / Л. И. Линевиц // Успехи биологической химии. – 1979. – Т. 20. – С. 71-89.
7. Гольнская Е. Л. Фитогемагглютинины пескика примулы как возможные белки генеративной несовместимости / Е. Л. Гольнская, Н. В. Башкирова, Н. Н. Томчук // Физиология растений. – 1976. – Т. 23, № 1. – С. 88-97.
8. Ковалёва Л. В. Спорофитно-гаметофитные взаимодействия в системе пыльца – пестик. 1. Лектины клеточных стенок / Л. В. Ковалёва // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 1. – С. 98-101.
9. Лазарева Е. А. Лектины оболочки пыльцевого зерна *Nicotiana tabacum* L. и их роль в активации прорастания / Е.А. Лазарева: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Физиология и биохимия растений». – М., 2009. – 24 с.
10. Southworth D. Lectins stimulate pollen germination / D. Southworth // Nature. – 1975. – Vol. 258. – P. 600-602.
11. Costa M. Expression-based and co-localization detection of arabinogalactan protein 6 and arabinogalactan protein 11 interactors in Arabidopsis pollen and pollen tubes / M. Costa, M. S. Nobre, J. D. Becker et al. // BMC Plant Biology – 2013. – Vol. 13. – P. 75-88.
12. Пат. 1031453 Україна, МПК7 С 07 К 3/02, С 07 К 3/28 / Левчук Г. М., Войтович О. М., Лях В. О. Спосіб виділення лектиноподібних білків рослин (заявник

- та патентовласник Запорізький національний університет). – № а 2013 00453; заявл. 14.01.13; опубл. 27.01.14., бюл. № 2.
13. Луцик М. Д. Лектины / Луцик М. Д., Панасюк В. М., Луцик А. Д. – Львов : Вища школа, 1981. – 156 с.
 14. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / Антонюк В. О. – Львів : Вища школа, 2005. – 554 с.
 15. Handbook of biochemistry / Dawson R., Eliot D., Eliot U., Jons K. – М., 1991. – 464 р.
 16. Лакин Г. Ф. Биометрия / Лакин Г. Ф. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с.
 17. Голынская Е. Л. Фитогемагглютинины генеративных органов растений и их возможное участие в реакции распознавания при взаимодействии пыльцы и пестика / Е. Л. Голынская // Молекулярная биология. – 1979. – Т. 23. – С. 34-43.

REFERENCES

1. Pandey A. K. Structure, development and reproduction in flowering plants: flower, sexual and vegetative reproduction, and significance of seed / A. K. Pandey // Bhagalpur : TM Bhagalpur University, 2006. – P. 18-23.
2. Ljah V.A. Botanicheskie i citogeneticheskie osobennosti vidov roda *Linum* L. i biotehnologicheskie puti raboty s nimi: monografija / Ljah V. A., Soroka A. I. – Zaporozh'e : Zaporozhskij nacional'nyj universitet, 2008. – 182 s.
3. Optasjuk O.M. Rid *Linum* L. u flori Ukraini / Optasjuk O.M., Shevera M.V. – К. : Al'terpres, 2011. – 276 s.
4. Sinskaja E.N. Biologija razvitija i fiziologii l'na / Sinskaja E.N. – М. : Agropromizdat, 1988. – 147 s.
5. Zhizn' rastenij: v 6-ti t. / [pod red. A. L. Tahtadzhjana, gl. red. chl.-kor. AN SSSR, prof. A. A. Fedorov]. – М. : Prosveshhenie, 1974. –Т. 5.2. – S. 270-274.
6. Linevich L.I. Lektiny i uglevod-belkovoje uznnavanie na raznyh urovnjah organizacii zhivogo / L. I. Linevich // Uspehi biologicheskoy himii. – 1979. – Т. 20. – S. 71-89.
7. Golynskaja E. L. Fitogemaggljutininy peskika primuly kak vozmozhnye belki generativnoj nesovmestivosti / E. L. Golynskaja, N. V. Bashkirova, N. N. Tomchuk // Fiziologija rastenij. – 1976. – Т. 23, № 1. – S. 88-97.
8. Kovaljova L. V. Sporofitno-gametofitnye vzaimodejstvija v sisteme pyl'ca – pestik. 1. Lektiny kletочnyh stenok / L. V. Kovaljova // Fiziologija rastenij. – 1999. – Т. 46, № 1. – S. 98-101.
9. Lazareva E. A. Lektiny obolochki pyl'cevoego zerna *Nicotiana tabacum* L. i ih rol' v aktivacii prorastanija / E. A. Lazareva: avtoref. dis. na soiskanie uchenoj stepeni kand. biol. nauk: spec. 03.00.12 «Fiziologija i biohimija rastenij». – М., 2009. – 24 s.
10. Southworth D. Lectins stimulate pollen germination / D. Southworth // Nature. – 1975. – Vol. 258. – P. 600-602.
11. Costa M. Expression-based and co-localization detection of arabinogalactan protein 6 and arabinogalactan protein 11 interactors in *Arabidopsis* pollen and pollen tubes / M. Costa, M. S. Nobre, J. D. Becker et al. // BMC Plant Biology – 2013. – Vol. 13. – P. 75-88.
12. Pat. 1031453 Ukraina, MPK7 S 07 K 3/02, S 07 K 3/28 / Levchuk G.M., Vojtovich O.M., Ljah V.O. Sposib vidilennja lektinopodibnih bilkiv roslin (zajavnik ta patentovlasnik Zaporiz'kij nacional'nyj universitet). – № а 2013 00453; zajavl. 14.01.13; opubl. 27.01.14., bjul. № 2.
13. Lucik M. D. Lektiny / Lucik M. D., Panasjuk V. M., Lucik A. D. – L'vov: Vishha shkola, 1981. – 156 s.
14. Antonjuk V. O. Lektini ta ih sirovinni dzherela / Antonjuk V.O. – L'viv : Vishha shkola, 2005. – 554 s.
15. Handbook of biochemistry / Dawson R., Eliot D., Eliot U., Jons K. – М., 1991. – 464 p.
16. Lakin G. F. Biometrija / Lakin G. F. – М. : Vysshaja shkola, 1990. – 351 s.
17. Golynskaja E. L. Fitogemaggljutininy generativnyh organov rastenij i ih vozmozhnoje uchastie v reakcii raspoznavanija pri vzaimodejstvii pyl'cy i pestika / E. L. Golynskaja // Molekuljarnaja biologija. – 1979. – Т. 23. – S. 34-43.