

ЛЕКТИНИ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО ЯК ФАКТОРИ АДАПТАЦІЇ ДО ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕСУ

Г.М. Левчук

Запорізький національний університет

На шести генотипах льону олійного був встановлений рівень їх стійкості до підвищеної та зниженої температур за допомогою комплексу критеріїв, які включали в себе морфологічний, фізіологічний та біохімічні показники стійкості. За цими показниками усі досліджені генотипи було розділено на 4 групи за рівнем стійкості: стійкі до гіпертермії, стійкі до гіпотермії, нестійкі до обох факторів та стійкі до обох факторів. Було з'ясовано, що характеристики лектинів різної клітинної локалізації змінюються, причому ці зміни залежать від типу стресу та спостерігаються тільки у стійких рослин. На основі цього зроблене припущення, що лектини можуть виступати факторами адаптації до екстремальних температур.

Ключові слова: льон олійний, адаптація, пролін, розчинні вуглеводи, приріст корінців, стійкість, гіпотермія, гіпертермія, лектини, спектр вуглеводної специфічності, коефіцієнт лектинової активності.

Вступ

Виявлення стратегії формування функціональних взаємовідносин рослин з оточуючим середовищем, яка забезпечує їх ріст, репродукцію та розповсюдження є одним з найактуальніших напрямків сучасної біології рослин [1].

У відповідь на несприятливі зміни екологічних факторів в рослинах відбуваються структурні та метаболічні перебудови, які протидіють стресу.

Не останню роль у формуванні стійкості відіграють лектини – глікопротеїни, які здатні розпізнавати та зв'язувати вуглеводи, розташовані та клітинних поверхнях. Характеризують їх за двома характеристиками: кількісною (лектинова активність) – мінімальна концентрація білку, яка проявляє біологічну активність та якісною (вуглеводна специфічність) – здатність розпізнавати певні вуглеводи [2].

За локалізацією у клітині лектини поділяють на три групи: мембранні (розташовані у мембранах – плазмалемі та органел), розчинні (знаходяться у цитозолі та вакуолярному соці) та лектини клітинних стінок [3, 4]. Деякі автори вказують на роль лектинів з різних клітинних фракцій у адаптації до абіотичних стресових факторів. Так, лектини клітинних стінок та мембран органел приймають участь у формуванні стійкості до морозу [5, 6], а розчинні лектини – до засолення [7, 8].

Метою нашої роботи було встановлення змін характеристик лектинів льону олійного в залежності від загального рівня стійкості рослини до гіпо- та гіпертермії.

Матеріал і методи досліджень. Насіння льону пророщували на фільтрувальному папері у чашках Петрі в вологій камері у темряві. Контролем у

всіх варіантах досліду слугували проростки, що вирощувались на дистильованій воді при кімнатній (22 °С) температурі на протязі 7 діб у темряві.

При моделюванні стресових умов насіння пророщували на дистильованій воді при кімнатній температурі [9] протягом 5 діб, після чого проростки разом впродовж 24 годин піддавали дії стресу (4 °С та 40 °С при гіпо- та гіпертермії відповідно) після чого вирощували при кімнатній температурі на дистильованій воді одну добу.

Стійкість рослин забезпечується сукупністю механізмів, які здатні перебудувати метаболізм таким чином, щоб рослина могла існувати при нових змінених умовах оточуючого середовища. Морфологічні ознаки стійкості є результатом біохімічних та фізіологічних перебудов. Тому для визначення рівня стійкості різних генотипів льону олійного ми визначали біохімічні (рівень вільного проліну [10] та розчинних вуглеводів [11], фізіологічні (рівень зв'язаної води) та морфологічні показники (приріст корінців проростків) [9].

Лектини екстрагували з різних клітинних фракцій (мембран, розчинної частини цитоплазми та клітинних стінок) за стандартними методиками [6, 12] з деякими модифікаціями. Активність лектинів визначали за допомогою реакції гемаглютинації з 2% суспензією еритроцитів кролика [3] з урахуванням концентрації білку [13]. При аналізі лектинову активність виражали як обернену величину – коефіцієнт лектинової активності. Вуглеводну специфічність визначали за допомогою пригнічення гемаглютинації окремими вуглеводами [12]. Дослідження проводились у п'ятикратному повторенні, результати оброблялися за допомогою стандартних статистичних методів [14].

Результати досліджень та їхнє обговорення. За комплексом проаналізованих ознак був встановлений рівень стійкості досліджених генотипів. Так, за морфологічним показником – приростом корінців проростків (рис. 1) можна судити про відносну стійкість льону – у толерантних сортів під впливом стресу корінець росте швидше.

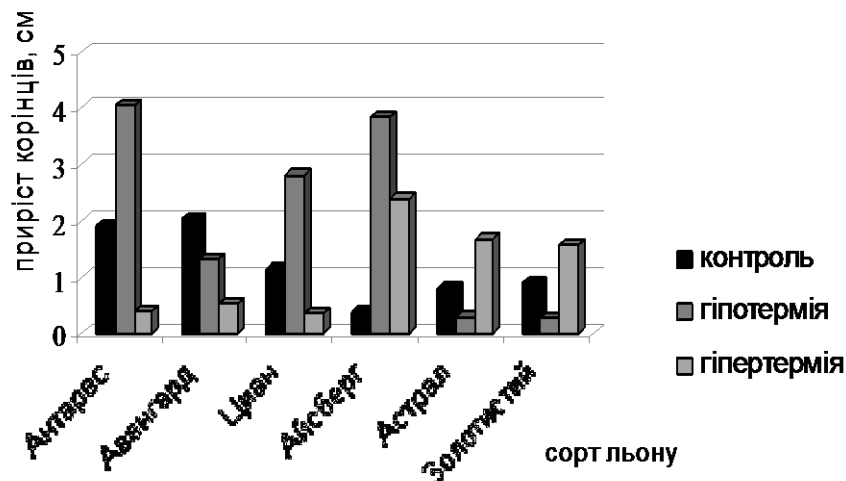


Рис. 1. Приріст корінців проростків льону олійного за дії стресів

Отже досліджені генотипи можна розподілити на 4 категорії:

- 1) стійкі до гіпотермії (Антарес та Циан) – при дії зниженої температури довжина корінців суттєво збільшується;
- 2) стійкі до гіпертермії (Астрал та Золотистий) – корінці швидше ростуть під впливом підвищеної температури;
- 3) стійкі до обох абіотичних чинників (сорт Айсберг) – при дії обох стресів приріст корінців збільшується;
- 4) нестійкі до жодного стресу (Авангард) – стрес пригнічує ріст корінців.

Для підтвердження такого розподілу сортів за стійкістю були проаналізовані також окремі маркерні фізіологічні та біохімічні показники.

При адаптації до обох стресів важливу роль відіграє здатність клітин утримувати воду, тобто достатньо показовим є вміст зв'язаної води. У нашому випадку (рис. 2) її вміст підвищувався за дії стресу у стійких генотипів, а у нестійких – знижувався.

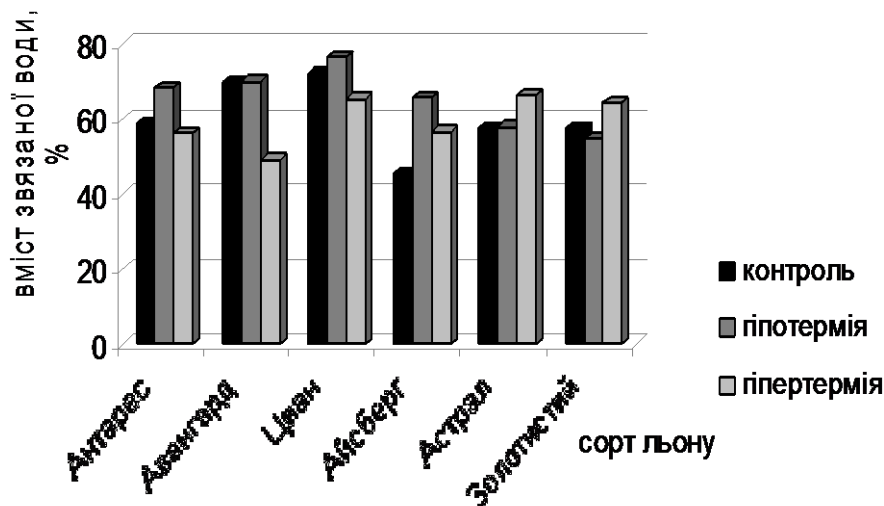


Рис. 2. Кількість зв'язаної води у проростках льону олійного за дії стресів

Так, підвищення спостерігається за дії підвищеної температури у проростків сортів Айсберг, Астрал та Золотистий, а за дії низької температури – у генотипів Антарес та Циан. Кількість зв'язаної води у проростках сорту Авангард знижується за дії гіпертермії, а за дії гіпотермії залишається на рівні контролю, тобто він є нестійким до гіпертермії та не адаптується до зниженої температури.

При дії екстремальних температур уповільнюються синтетичні процеси та активізуються процеси розкладу. Тому кількість полімерів, кількість мономерів (таких як амінокислоти – насамперед пролін – та розчинні вуглеводи) – збільшується.

Вивільнені мономери є осмотично активними речовинами та здатні зв'язувати вільну воду. Тому суттєве збільшення їх кількості у процесі адаптації є проявом стійкості.

Тому окрема роль у формуванні адаптаційної відповіді належить біохімічним показникам - вільному проліну та розчинним вуглеводам. Перший є маркером стійкості до гіпертермії, а другий – до гіпотермії [6].

У нашому випадку (рис. 3) рівень розчинних вуглеводів збільшувався у сортів Антарес, Ціан та Айсберг, які ми за морфологічними та фізіологічними показниками віднесли до холодостійких. У інших генотипів рівень цього показника або не змінюється (сорт Авангард), або зменшується (сорт Астрал та Золотистий).

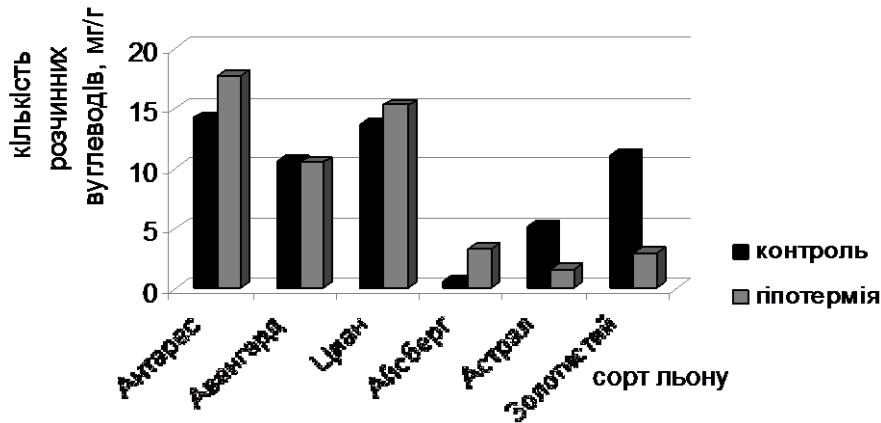


Рис. 3. Кількість розчинних вуглеводів у проростках льону олійного за дії стресів

Стосовно рівня стійкості проростків сорту Авангард до зниженої температури хочеться відмітити, що у них не проходить етапу адаптації, хоча даний тип стресу і майже не пригнічує рослини цього генотипу. Це пов'язано, на нашу думку, з низьким рівнем стресового впливу саме на цей генотип. Тому він був нами віднесений до нечутливого до даного рівня стресу.

Одним з біохімічних маркерів стійкості рослин до дії підвищеної температури є рівень вільного проліну. Ця амінокислота вивільняється при дії стресових факторів та сприяє захисту білків при зневодненні, тому тим вищий рівень цього метаболіту за дії стресу, тим більш стійкою є рослина [9].

У нашому випадку (рис. 4) його рівень суттєво збільшився у жаростійких генотипів (сорт Айсберг, Астрал та Золотистий), причому рівень підвищення у перших двох був набагато суттєвішим (майже у 5 разів).

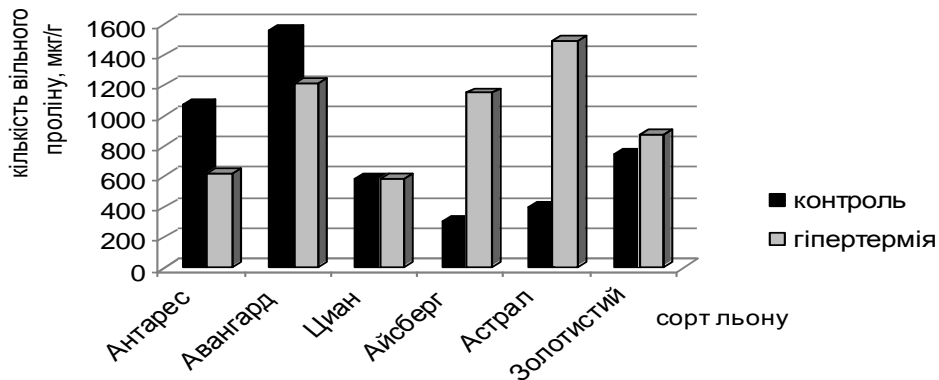


Рис. 4. Кількість вільного проліну у проростках льону олійного за дії стресів

Аналіз змін усіх чотирьох ознак внаслідок стресів підтвердив зроблений попередній висновок. А саме, сорти Антарес, Циан та Айсберг є стійкими до охолодження, сорти Астрал та Золотистий – стійкими до підвищеної температури, а сорт Авангард виявився таким, що не проявляє ознак адаптаційних перебудов до обох стресових факторів (до гіпотермії він є нечутливим, а до підвищеної температури – нестійким).

З літературних даних відомо [3, 4], що у процесі адаптації до абіотичних стресових факторів різної природи приймають участь лектини.

Тому було проаналізовано рівень активності та вуглеводну специфічність лектинів різних клітинних фракцій.

Таблиця 1

Коефіцієнт активності лектинів різних клітинних фракцій в залежності від стресового впливу

Вид стресу	Сорт льону					
	Антарес	Авангард	Циан	Айсберг	Астрал	Золотистий
Мембранні лектини						
гіпотермія	4,54	31,92	12,84	5,49	48,15	1059,17
гіпертермія	1,38	16,51	54,67	210,31	1493,06	434,91
Розчинні лектини						
гіпотермія	473,99	2,65	30,85	100,33	859,01	1,34
гіпертермія	2699,42	216,423	8,99	642,38	1,67	1,22
Лектини клітинних стінок						
гіпотермія	2913,79	21,12	100673	106579	3,58	18,61
гіпертермія	31,07	213,51	20896	44,29	73,64	7372,88

Примітка: дані приведені у % відносно контролю

Встановлено, що у процесі адаптації лектини змінюються. Так, кількісна характеристика лектинів – коефіцієнт лектинової активності змінюється суттєво, але по-різному в залежності від рівня стійкості сорту, виду стресового впливу та клітинної локалізації лектину (табл. 1).

Таблиця 2

Вуглеводна специфічність розчинних лектинів різних клітинних фракцій холодостійких генотипів льону олійного

Вид стресу	вуглеводи									
	гал	глю	ман	ксі	ара	мальт	сах	лакт	фр	гл А
Циан										
контроль	+				+					
гіпотермія	+				+			+	+	
Антарес										
контроль					+	+	+			
гіпотермія		+	+	+	+	+		+	+	
Айсберг										
контроль					+	+				
гіпотермія					+	+		+	+	

Примітка: «+» - пригнічення реакції гемаглютинації конкретним вуглеводом

Якщо зіставити рівень активності лектинів з рівнем стійкості, досить чітко простежуються наступні закономірності:

- суттєво збільшується рівень активності мембранних лектинів (у 2-15 разів) при дії підвищеної температури у стійких сортів (Айсберг, Астрал та Золотистий), а у нестійких – знижується (на 50-98 %);

- суттєво збільшується рівень активності лектинів клітинних стінок (у 29-1000 разів) при дії зниженої температури у стійких сортів (Антарес, Циан та Айсберг), а у нестійких – знижується (на 79-96 %).

Активність розчинних лектинів знижується, але закономірностей залежно від стійкості при цьому не спостерігається.

Таблиця 3

Вуглеводна специфічність розчинних лектинів різних клітинних фракцій жаростійких генотипів льону олійного

Вид стресу	вуглеводи									
	гал	глю	ман	ксі	ара	мальт	сах	лакт	фр	гл А
Айсберг										
контроль					+	+				
гіпотермія		+			+	+				+
Астрал										
контроль					+			+	+	
гіпотермія		+			+			+	+	+
Золотистий										
контроль					+	+		+	+	
гіпотермія		+			+			+	+	+

Примітка: «+» - пригнічення реакції агрегації конкретним вуглеводом

Якісна характеристика лектинів у процесі адаптації також змінюється, але ця зміна спостерігається тільки у розчинних лектинів і залежить від рівня стійкості та ступеню адаптаційних змін (спостерігаються зміни тільки у генотипів, які проходять період адаптації) та від виду стресового впливу (табл. 2, табл. 3).

Як видно з табл. 2 у стійких до гіпотермії генотипів спектр вуглеводної специфічності при адаптації змінюється та з'являється ще здатність розпізнавати фруктозу. У проростків сорту Антарес окрім цього з'являється здатність розпізнавати ще й лактозу.

У стійких до гіпертермії генотипів також змінюється спектр вуглеводної специфічності та з'являється здатність розпізнавати та зв'язувати глюкозу та глюкозамін.

Висновки

Таким чином, можна стверджувати, що у формуванні стійкості до екстремальних температур приймають участь лектини різної клітинної локалізації: розчинні змінюють спектр вуглеводної специфічності при обох стресах, а мембранні лектини та лектини клітинних стінок підвищують свою активність при дії гіпер- та гіпотермії відповідно. Крім того, лектини можна віднести до специфічних факторів стійкості: при формуванні жаростійкості підвищується активність мембранних лектинів та з'являється здатність у

розчинних лектинів розпізнавати глюкозу або глюкозамін; а при формуванні холодостійкості – підвищується активність лектинів клітинних стінок та з'являється здатність у розчинних лектинів розпізнавати лактозу або фруктозу.

Література

1. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений: учеб. пособие / Т.В. Чиркова. - СПб.: изд-во С.-Петерб. Ун-та, 2002. – 244 с.
2. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Под ред. Е.Л. Кордюм. – К.: Наукова думка, 2003. – 227 с.
3. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Львів, 2005. – 554 с.
4. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция / Ф.М. Шакирова. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
5. Тимофеева О.А. Индуцированные модификаторами цитоскелета изменения активности лектинов при адаптации растений к низким температурам и обработке АБК / О.А. Тимофеева, Л.П. Хохлова, Т.В. Трифонова, Н.Е. Беляева, Ю.Ю. Чулкова // Физиология растений. - 1999. – Т. 46, № 2. – С. 181-186.
6. Комарова Э.Н. Активность лектиноподобных белков клеточных стенок и внешних мембран органелл и их связь с эндогенными лигандами в проростках озимой пшеницы при холодной адаптации / Э.Н. Комарова, Э.И. Вискребенцева, Т.И. Трунова // Физиология растений. – 2003. – Т.50, № 4. – С. 511-516.
7. Кильдибекова А.Р. Механизмы защитного влияния агглютинина зародыша пшеницы на рост клеток корней проростков пшеницы при засолении / А.Р. Кильдибекова, М.В. Безрукова, А.М. Авальбаев, Р.А. Фатхутдинова, Ф.М. Шакирова // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 312-315.
8. Шакирова Ф.М. Механизмы регуляции накопления лектина в проростках пшеницы при засолении / Ф.М. Шакирова, М.В. Безрукова, А.М. Авальбаев, Р.А. Фатхутдинова // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 341-345.
9. Практикум по росту и устойчивости растений / [В.В. Полевой, Т.В. Чиркова, Л.А. Лутова и др.]; под ред. В.В. Полевого, Т.В. Чирковой. – СПб.: изд-во С.-Петерб. Ун-та, 2001. – 212 с.
10. Bates L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies / L.S. Bates, R.P. Maldren, L.D. Teare // Plant and soil, - 1973. - Vol. 39, № 1. - P. 205.
11. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. / Б.П. Плешков; [3-е изд. доп. пер.]. – Агрпромиздат. – 1985. - 255с.
12. Луцик М.Д. Лектины / М.Д. Луцик, В.М. Панасюк, А.Д. Луцик. – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
13. Doseon R. Handbook of biochemist / R. Doseon, D. Eliot, U. Eliot, K. Jons. – М., 1991. – 464 p.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин – М.: Высшая школа, 1990. – 351 с.

LECTINS OF OIL FLAX AS FACTORS OF ADAPTATION TO TEMPERATURE STRESS

Hanna Levchuk

The level of resistance to main abiotic stress factors such as higher and lower temperatures through the complex of criteria which included morphological, physiological and biochemical indicators of tolerance, was established for six genotypes. All studied genotypes were divided into 4 groups according to the level of stability: resistant to hyperthermia, resistant to hypothermia, vulnerable to both factors and resistant to both. It was found that the characteristics of lectins of different cellular localization of change, and these changes depend on the type of stress and is observed only in resistant plants. Based on this assumed that lectins may act as factors of adaptation to extreme temperatures.

Key words: oil flax, adaptation, proline, soluble carbohydrate, root augmentation, stability, hypothermia, hyperthermia, lectins, spectrum carbohydrate specificity, lectin activity coefficient.

ЛЕКТИНЫ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО КАК ФАКТОРЫ АДАПТАЦИИ К ТЕМПЕРАТУРНОМУ СТРЕССУ

А.Н. Левчук

На шести генотипах льна масличного был установлен уровень их устойчивости к повышенной и пониженной температурам с помощью комплекса критериев, которые включали в себя морфологический, физиологический и биохимический показатели. По этим показателям все исследованные генотипы были разделены на 4 группы по степени устойчивости: устойчивые к гипертермии, устойчивые к гипотермии, неустойчивые к обоим факторам и устойчивые к обоим факторам. Было выяснено, что характеристики лектинов разной клеточной локализации меняются, причем эти изменения зависят от типа стресса и наблюдаются только в устойчивых растений. На основе этого сделано предположение, что лектины могут выступать факторами адаптации к экстремальным температурам.

Ключевые слова: лен масличный, адаптация, пролин, растворимые углеводы, прирост корешков, устойчивость, гипотермия, гипертермия, лектины, спектр углеводной специфичности, коэффициент лектиновой активности.

Рецензент: Ю.О. Махно, канд. с.-г. наук, зав. лаб. селекції льону Інституту олійних культур НААН.