



ORIGINAL ARTICLE

Lectin Activity of Different Cell Fractions of Winter Wheat Seedlings under Pathogenesis

Y.M. Pysmenna*, O.O. Panyuta, N.Yu. Taran

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine", Kyiv, 03022, Ukraine

*E-Mail: pismennaya1992@mail.ru

Received December 28, 2016

Crop diseases cause large yield losses and are the major factors which limit the increase of agricultural production. The question of the lectins participation in the pathogens recognition and the formation of protective reactions of the plant is relevant. Changes in lectin activity of different cell fractions in organs of winter wheat seedlings (*Triticum aestivum*) under biotic stress were investigated. It was established that lectin activity of cell walls and cell organelles of uninfected seedlings was lower than lectin activity of both fractions of infected with eyespot causal agent seedlings. Lectin activity dynamics of various cell fractions was different under infection. Reaction response was more expressed in wheat seedlings of relatively resistant to pathogen variety Renan than in seedlings of susceptible variety Myronivska 808. Identified changes in activity of lectins of various cell fractions of both organs indicate their involvement in formation of protective reactions under the pathogenesis.

Key words: cell walls and cell organelles, eyespot causal agent, changes in lectin activity, pathogenesis, winter wheat, seedlings

Среди факторов, которые ограничивают реализацию генетически детерминированной продуктивности пшеницы, не последнее место занимают болезни. Пшеницу поражают более 100 болезней и половину из них составляют грибные заболевания (Rana, 2014). Среди этих болезней серьезную опасность представляет церкоспореллез, или глазковая пятнистость. Возбудителем болезни является гриб *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton. По Международному каталогу названий грибов (Index Fungorum) современное название этого гриба – *Oculimacula yallundae* (Wallwork & Spooner) Crous & W. Gams (2003). Зарегистрированы синонимы: *Cercospora herpotrichoides* (Fron), (1912); *Helgardia herpotrichoides* (Fron) Crous & W. Gams (2003); *Ramulispora herpotrichoides* (Fron) Arx (1983); *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner (1988); *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner (1988) var. *yallundae*. Существенный вред болезнь наносит озимой пшенице в странах северной Европы и на северо-западе США. Болезнь более опасна для озимой пшеницы, чем для яровой. Церкоспореллезом поражаются как всходы, так и взрослые растения озимой пшеницы.

Среди веществ, которые участвуют в биологическом распознавании особое значение принадлежит лектинам – белкам, способным связывать углеводы и углеводные детерминанты гликозилированных биополимеров, не вызывая их химических превращений (Sytnikov, Kots, 2009).

Белки, имеющие лектиновую активность (ЛА), содержатся в различных органах растения – стеблях, листьях, корнях, клубнях, луковичах, корневищах, а также корневых клубнях и генеративных органах. Их количество и локализация могут изменяться в широких пределах, а активность зависит от биотических и абиотических воздействий внешней среды. Кроме того, выявлены изменения ЛА в годовом цикле развития растений (Levchuck *et al.*, 2012).

Содержание лектинов в клеточных стенках, плазматических мембранах и мембранах органелл дает основание предположить, что они, контролируя

рецепторную и транспортную функцию мембран, участвуют в реакциях клетки на действие различных стрессоров (Komarova *et al.*, 2003).

В последнее время появились данные об участии лектинов в реакциях растений на неблагоприятные условия внешней среды. Отсутствие сведений об изменениях ЛА различных клеточных фракций при биотическом стрессе подтолкнуло к проведению исследований изменения ЛА фракции клеточных стенок и суммарной фракции клеточных органелл надземной и подземной частей проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух сортов при инфицировании.

MATERIALS AND METHODS

В опытах использовали проростки озимой пшеницы двух сортов, которые отличаются по устойчивости к возбудителю церкоспореллеза *P. herpotrichoides* – чувствительного Мироновская 808 и относительно устойчивого Renap.

Стерилизованные семена выращивали в песчаной культуре (кварцевый песок – марка ВС-050-2 по ГОСТ 22551-77, фракция №4 0,8-1,6 мм), инфицировали суспензией конидий возбудителя церкоспореллеза (Panyuta *et al.*, 2014). Использовали высоковирулентный штамм 543 7/1 *P. herpotrichoides*. Контроль опрыскивали дистиллятом. Растения выращивали при температуре 24 ° С, освещение 6 клк, в условиях 16-часового фотопериода, использовали питательную среду Хогланда-Арнона.

Отбор растительного материала проводили на 1, 3 и 5 сутки после заражения, что совпадает с фазами развития инфекции.

Лектиноподобные белки клеточных стенок и клеточных органелл выделяли по методике, описанной Комаровой с соавторами (Komarova *et al.*, 1995) с нашими модификациями. Навеску растительного материала гомогенизировали в растворе «А», который содержал 20 мМ калийфосфатный буфер (рН 7,4), 0,05 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСО), 0,5 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 10 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) и 0,36 М сахарозу

при соотношении навески и буфера 1:3 (масса: объем). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 10000 g.

Для выделения лектиноподобных белков клеточных стенок, полученный осадок, содержащий клеточные стенки, трижды центрифугировали по 5 мин при 10000 g в 20 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4). Осадок ресуспендировали в том же буфере и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Надосадочную жидкость отбрасывали, а из осадка (клеточные стенки) выделяли лектиноподобные белки раствором «Б», который содержал 20 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 0,05 мМ ФМСО, 0,5 мМ ДТТ, 10 мМ ЭДТА, 0,36 М сахарозу, 0,9% хлорид натрия, 0,05% Тритон X-100, настаивали в течение 4 ч при постоянном перемешивании. Экстракт центрифугировали 30 мин при 20000 g. В надосадочной жидкости определяли лектиновую активность.

Для выделения лектиноподобных белков фракции клеточных органелл надосадочную жидкость, которую получили после гомогенизирования навески растительного материала, центрифугировали 60 мин при 10000 g. Супернатант сливали, а осадок, содержащий элементы клеток, ресуспендировали в растворе «В», который содержал 20 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 0,05 мМ ФМСО, 0,5 мМ ДТТ, 10 мМ ЭДТА, 0,36 М сахарозу и 0,05% Тритон X-100, измельчали в стеклянном гомогенизаторе 10-15 мин и центрифугировали 10 мин при 5000 g. В надосадочной жидкости определяли ЛА.

Лектиновую активность определяли методом ратусэритроагглютинации (Pogorila et al., 2002). ЛА рассчитывали по формуле, как величину, обратную к минимальной концентрации белка, которая вызвала реакцию агглютинации эритроцитов крысы.

Содержание общего белка в выделенных экстрактах определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Результаты обработаны статистически. Достоверность разницы между вариантами оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$ (Dospikhov, 1985).

RESULTS AND DISCUSSION

В результате проведенных исследований установили, что лектиноподобные белки клеточных стенок и клеточных органелл проростков пшеницы по-разному реагируют на инфицирование фитопатогенным грибом *P. herpotrichoides*. Самая высокая ЛА фракции клеточных стенок неинфицированных и инфицированных проростков пшеницы сортов Renan и Мироновская 808 наблюдалась на 1 сутки эксперимента (рис. 1.). Это установлено как для надземной, так и для подземной частей проростков.

По нашему мнению, высокое значение ЛА на 1 сутки после инфицирования может быть связано с тем, что клеточная стенка является первым барьером, с которым взаимодействует фитопатоген, а лектины и лектиноподобные белки клеточной стенки участвуют в распознавании и иммобилизации чужого, а также в передаче внешнего сигнала в различные компартменты клетки.

Сравнение ЛА клеточных стенок контрольных и опытных вариантов показало, что в случае инфицирования ЛА клеточных стенок надземной части проростков пшеницы сорта Renan выше, чем в контроле в 2,0-3,7 раза, а проростков сорта Мироновская 808 – в 1,7-1,9 раза.

Лектиновая активность клеточных стенок подземной части инфицированных проростков пшеницы сорта Renan была выше, чем в контроле в 1,5-3,2 раза, а проростков сорта Мироновская 808 – в 1,6-1,7 раза.

Следует отметить, что при инфицировании ЛА клеточных стенок надземной и подземной частей проростков пшеницы относительно устойчивого сорта Renan в течение эксперимента была выше ЛА клеточных стенок проростков восприимчивого сорта Мироновская 808 в 1,2-1,8 и в 1,3-2,4 раза соответственно (рис. 1). По нашему мнению, это связано с различным уровнем устойчивости исследуемых сортов к данному патогену (Belava et al., 2009; Panyuta et al., 2014).

Активность лектинов клеточных стенок подземной части проростков пшеницы обоих сортов в первые сутки после заражения была в 1,5-1,7 раза

выше таковой надземной части, после чего стала уменьшаться и была ниже, чем ЛА надземной части.

Динамика ЛА фракции клеточных органелл отличалась от динамики ЛА фракции клеточных стенок. Максимальная лектиновая активность фракции клеточных органелл надземной и подземной частей инфицированных проростков пшеницы обоих сортов отмечена на 3 сутки после заражения (рис. 2). То есть при инфицировании регистрировали стремительное нарастание активности вещества, отвечающего за межклеточное распознавание, связывание и запуск сигнальных систем, что бесспорно указывает на участие лектинов и лектиноподобных белков в формировании реакции-ответа на воздействие патогена. Спад ЛА к 5 суткам обусловлен тем, что при взаимодействии растения-хозяина и чужеродного агента происходит максимальное связывание имеющимися молекулами лектина и лектиноподобных белков чужеродных клеток, торможение проникновения и дальнейшего распространения патогена.

Сравнение ЛА клеточных органелл контрольных и опытных вариантов показало, что при инфицировании ЛА клеточных органелл надземной части проростков пшеницы сорта Renap была в 2,2-3,9 раза выше, чем в контроле, а проростков сорта Мироновская 808 – в 2,2-6,0 раз. Лектиновая активность клеточных органелл подземной части инфицированных проростков пшеницы сорта Renap была выше, чем в контроле в 1,7-2,7 раза, а проростков сорта Мироновская 808 – в 1,6-2,4 раза.

Следует отметить, что при инфицировании ЛА клеточных органелл надземной и подземной частей проростков пшеницы относительно устойчивого сорта Renap в течение эксперимента была выше ЛА проростков восприимчивого сорта Мироновская 808 в 1,1-2,9 раза и в 1,1-1,6 раза соответственно (рис. 2).

Активность лектинов клеточных органелл подземной части проростков пшеницы обоих сортов на 3 сутки после заражения была в 3,2-6,9 раза выше таковой надземной части.

Обнаруженное постепенное снижение ЛА

клеточных стенок согласуется с данными литературы о выделении развивающимися корнями проростков лектинов в почву для формирования собственной микросреды, чтобы предотвратить развитие нежелательных микроорганизмов (Belava *et al.*, 2009).

Не смотря на то, что при инфицировании максимальная ЛА клеточных органелл проростков пшеницы используемых сортов отмечена на 3 сутки, изменения этого показателя менее динамичны у проростков восприимчивого сорта Мироновская 808, чем у резистентного сорта Renap. По нашему мнению, это связано со слабыми защитными реакциями восприимчивого сорта, а также стратегией маскировки фитопатогенного гриба.

Итак, при инфицировании максимальная ЛА фракции клеточных органелл проростков пшеницы обоих сортов обнаружена на 3 сутки и она была выше ЛА клеточных органелл неинфицированных проростков.

Более высокий уровень ЛА клеточных органелл проростков пшеницы относительно устойчивого сорта Renap при инфицировании может свидетельствовать о качественных изменениях в функционировании их лектин-лигандной системы, что, по нашему мнению, обусловлено уровнем устойчивости к церкоспореллезу.

Высокий уровень ЛА фракции клеточных стенок, по отношению к фракции клеточных органелл контрольных проростков обоих сортов может быть следствием формирования клеточных стенок. Согласно данным Алексидзе с соавторами ЛА в основном обнаружена в клеточных стенках (Aleksidze *et al.*, 1984). При инфицировании происходит укрепление клеточных стенок, существенное значение в котором имеют структурные белки растений, в частности оксипролин-богатые белки, к которым относятся экстенсины, арабиногалактановые белки и лектины. То есть лектины и лектиноподобные белки могут участвовать в укреплении клеточных стенок.

Следует отметить, что динамика ЛА фракции клеточных стенок существенно отличается от динамики ЛА фракции клеточных органелл. По

нашему мнению, это объясняется тем, что роль лектинов и лектиноподобных белков различных

клеточных фракций в формировании реакции-ответа на патогенез разная.

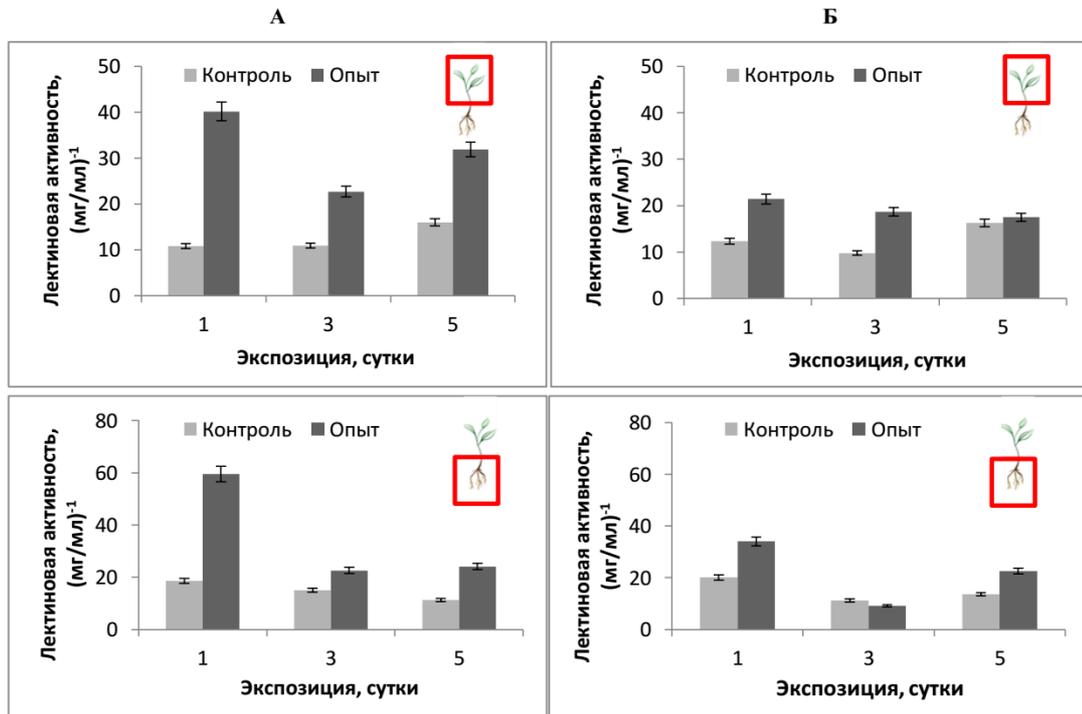


Figure 1. Лектиновая активность клеточных стенок проростков пшеницы при инфицировании *P. herpotrichoides*: А – сорт Renan, Б – сорт Мироновская 808

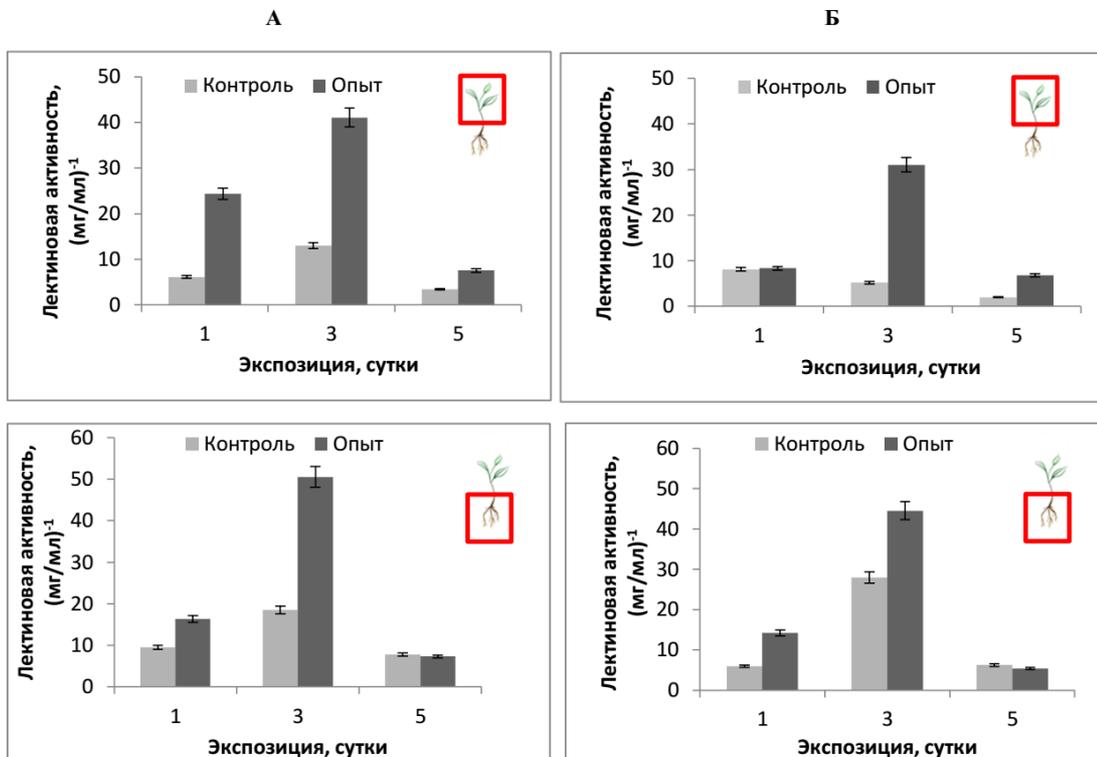


Figure 2. Лектиновая активность клеточных органелл проростков пшеницы при инфицировании *P. herpotrichoides*: А – сорт Renan, Б – сорт Мироновская 808

Table 1. Содержание белка в разных клеточных фракциях надземной и подземной частей проростков озимой пшеницы при инфицировании

| Эксп., сутки | Содержание белка, мг/г | | | |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| | фракция клеточных стенок | | фракция клеточных органелл | |
| | контроль | опыт | контроль | опыт |
| сорт Renap | | | | |
| надземная часть | | | | |
| 1 | 0,37±0,01 | 0,40±0,02 | 0,66±0,06 | 0,33±0,02 |
| 3 | 0,37±0,01 | 0,35±0,01 | 0,61±0,04 | 0,39±0,03 |
| 5 | 0,50±0,03 | 0,50±0,02 | 1,18±0,05 | 1,06±0,06 |
| подземная часть | | | | |
| 1 | 0,32±0,03 | 0,24±0,04 | 0,22±0,02 | 0,27±0,02 |
| 3 | 0,43±0,05 | 0,32±0,03 | 0,27±0,03 | 0,35±0,04 |
| 5 | 0,26±0,01 | 0,27±0,01 | 0,36±0,02 | 0,33±0,01 |
| сорт Мироновская 808 | | | | |
| надземная часть | | | | |
| 1 | 0,33±0,02 | 0,37±0,01 | 0,49±0,07 | 0,96±0,09 |
| 3 | 0,41±0,01 | 0,43±0,01 | 0,77±0,08 | 0,52±0,05 |
| 5 | 0,49±0,02 | 0,46±0,02 | 1,01±0,08 | 0,59±0,06 |
| подземная часть | | | | |
| 1 | 0,20±0,03 | 0,12±0,04 | 0,34±0,02 | 0,28±0,01 |
| 3 | 0,36±0,03 | 0,44±0,03 | 0,29±0,02 | 0,36±0,03 |
| 5 | 0,29±0,04 | 0,36±0,02 | 0,32±0,02 | 0,37±0,01 |

Важное значение для жизнедеятельности растений имеет белковый обмен. Количественное содержание белка является качественным показателем жизнеспособности растительного организма. Содержание белка в растениях зависит как от видовых и сортовых особенностей, так и от воздействия факторов окружающей среды.

Содержание общего белка во фракции клеточных стенок надземной части проростков обоих сортов пшеницы менялось в течение эксперимента. Следует отметить, что оно было ниже содержания белка во фракции клеточных органелл (табл. 1).

Содержание белка во фракции клеточных стенок подземной части проростков, подобно надземной части, в течении 3 суток, было ниже во фракции клеточных органелл. На 5 сутки статистически достоверных различий не обнаружили (табл. 1).

Содержание белка в клетках проростков озимой пшеницы зависит не только от места локализации в

клетке, но и от сорта пшеницы.

По данным литературы накопление лектиноподобных белков и лектинов связано с индукцией устойчивости растения-хозяина (Shakirova, Bezrukova, 2007). Результаты наших исследований показали, что ответная реакция у проростков пшеницы относительно устойчивого к возбудителю церкоспореллеза сорта Renap была выражена сильнее, чем у проростков восприимчивого сорта Мироновская 808. Высокий уровень ЛА проростков пшеницы сорта Renap может быть связан с наличием в геноме растений этого сорта одного из четырех известных генов устойчивости к *P. herpotrichoides* – гена *Pch1* (Wei Le et al., 2011).

Защитные функции лектинов и лектиноподобных белков связывают с передачей сигналов внутрь клетки, что связано с ионными потоками, которые возникают в результате изменения проницаемости

мембран при взаимодействии мембранных лектинов с гликоконъюгатами патогенов (Belava et al., 2009). То есть лектины и лектиноподобные белки мембран органелл участвуют в восприятии внешних сигналов клетки. Возможно, изменение ЛА фракции клеточных органелл связано с изменением активности мембран при патогенезе.

Одной из функций лектинов и лектиноподобных белков является распознавание и иммобилизация патогенов в результате связывания углеводов клеточных стенок последних. Такое связывание является первым этапом запуска реакции гиперчувствительности при инфицировании. В литературе имеются данные о вовлечении лектинов пшеницы, в частности агглютинаина зародышей пшеницы, в усиление производства активных форм кислорода, что подтверждает предположение о способности лектинов запускать в растении-хозяине защитные реакции, в том числе и реакцию гиперчувствительности, в ответ на инфицирование (Mamenko, 2014).

Изменение ЛА при инфицировании может быть следствием трансляционных и посттрансляционных событий. Быстрый рост ЛА возможен в результате конформационных перестроек молекулы белка и изменения доступности углеводов-связывающих центров или увеличения количества этих белков за счет их новообразования. Кроме того, при стрессе может изменяться углеводный состав клетки, в результате чего происходит увеличение или уменьшение связывания лектинов со специфическими для них углеводами, что может влиять на их активность.

Изменение содержания или активности белков является одним из признаков их участия в реакции устойчивости / восприимчивости растения, что подтвердили результаты наших исследований.

Высшее значение ЛА различных клеточных фракций при инфицировании свидетельствует об участии лектинов и лектиноподобных белков в формировании ответной реакции проростков пшеницы на действие биотического стрессора.

REFERENCES

- Aleksidze G.A., Vyskrebentseva E.I., Korolev N.P. (1984). Purification and some properties of lectin from a cell wall fraction of the sugar-beet roots. *Plant physiology*, **31(6)**, 1021-1027.
- Belava V.N., Panyuta O.O., Taran N.Yu. (2009). The role of lectins in the plants defence reactions to phytopathogens. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, **41(3)**, 221-234.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem*, **72(1)**, 248-254.
- Dospekhov B.A. (1985). Methods of the field experience. *M.: Agropromizdat*, 315 p.
- Komarova E.N., Vyskrebentseva E.I., Trunova T.I. (1995) The changes of the lectin activity of the meristem of the tillering node of winter wheat during hardening to frost. *Plant Physiology*, **42(4)**, 612-615.
- Komarova E.N., Vyskrebentseva E.I., Trunova T.I. (2003) Activity of lectin-like proteins of the cell walls and the outer organelle membranes as related to endogenous ligands in cold-adapted seedlings of winter wheat. *Russian Journal of Plant Physiology*, **50(4)**, 511-516.
- Levchuck G., Voitovich H., Lyakh V. (2012) The change of lectinlike proteins of oil flax in ontogenesis. *Bulletin of Lviv University. The biology series*, **60(1)**, 307-314.
- Mamenko P.M. (2014). The functions of plants lectins under abiotic and biotic stresses. *Plant physiology and genetics*, **46(2)**, 95-107.
- Panyuta O.O., Belava V.N., Taran N.Yu (2014). The patent for utility model 389960, Ukraine, A01N 1/04. Method of infecting for resistance estimation of winter wheat to eyespot causal agent. *Bull. №9. Applications. 01/11/2013. Publish. 05/12/2014.*
- Pogorila N.F., Surzhyk L.M., Pogorila Z.O. (2002). New method of plant lectin testing. *Ukr. Botan. Journ*, **59(2)**, 217-220.
- Rana S.S., Rana R.S. (2014). Advances in crop growth and productivity. *Department of Agronomy, CSK Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya,*

Palampur, 230 p.

Shakirova F.M., Bezrukova M.V. (2007). Current knowledge about presumable functions of plant lectins. *Journal of General Biology*, **68(2)**, 109-125.

Sytnikov D.M., Kots S.Ya. (2009). Participation of lectins

in plant physiological processes. *Physiology and biochemistry of cultural plants*, **41(4)**, 279-296.

Wei Le, Muranty H., Zhang H. (2011) Advances and prospects in wheat eyespot research: contributions from genetics and molecular tools. *Journal of Phytopathology*, **159(7-8)**, 457-470.