

О. В. Ришаківа¹, к.б.н., науковий співробітник

О. О. Молодченкова¹, д.б.н., старший науковий співробітник

С. А. Петров², д.б.н., професор,

¹Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, Овідіопольська дор., 3, Одеса, Україна,
e-mail: olgamolod@ukr.net

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, біологічний факультет, кафедра біохімії, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна,
e-mail: Serpet2015@ukr.net

БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОЗЧИННИХ ЛЕКТИНІВ КУКУРУДЗИ В УМОВАХ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ ТА ГІПЕРТЕРМІЇ

Вивчено вплив водного дефіциту та гіпертермії на активність розчинних лектинів в проростаючих зернівках контрастних за ознакою посухостійкості ліній кукурудзи (*Zea mays* L.). Показано, що лінії кукурудзи, які достовірно відрізняються за рівнем посухостійкості, характеризуються диференційованою зміною активності лектинів. Методами висолювання сульфатом амонію, діалізу та афінної хроматографії були виділені та очищені розчинні лектини з 3-добових проростків кукурудзи, відмінних за ознакою посухостійкості, що зазнали впливу водного дефіциту і гіпертермії. Показано, що молекулярна маса виділених лектинів знаходиться в області 50–60 кДа та вони володіють високою спорідненістю до N-ацетилглюкозаміну і D-фруктозо-6-фосфату.

Ключові слова: *Zea mays* L.; розчинні лектини; водний дефіцит; гіпертермія; виділення та очищення.

Посуха та підвищені температури є одними з основних чинників навколишнього середовища, які лімітують продуктивність зернових культур в багатьох ґрунтово-кліматичних зонах, особливо в Південних посушливих районах України. Відгук рослин на посуху та підвищену температуру включає взаємодію між різноманітними молекулярними та фізіолого-біохімічними процесами. Розуміння механізмів впливу посухи на метаболізм рослин допоможе частково вирішити питання з покращення врожаю або зменшити наслідки її впливу. Поряд із синтезом стресових білків в несприятливих умовах відбувається посилення синтезу ряду присутніх у нормальних умовах білків, до яких відносяться і лектини [2, 9, 6]. На підтримку цього свідчать дані про суттєве накопичення лектинів у коріннях проростків кукурудзи за впливу теплового шоку та водного дефіциту [1], при загартуванні до холоду [4], а також в умовах дії біотичних чинників [7, 10]. Наведені дані дозволяють розглядати лектини як учасників неспецифічних пристосувально-захисних реакцій рослин.

Метою даного дослідження було визначення активності розчинних лектинів, виділення і вивчення їх біохімічних властивостей у тканинах проростків ліній кукурудзи (*Zea mays* L.), відмінних за ознакою посухостійкості, що зазнали впливу водного дефіциту і гіпертермії.

Матеріали та методи досліджень

У дослідженнях використовували модельну вибірку самозапилених ліній кукурудзи (*Zea mays* L.), контрастних за ознакою посухостійкості: посухостійкі та жаростійкі лінії кукурудзи Од329зМ, ИК107зМ непосухостійкі та нежаростійкі лінії кукурудзи ГК26зМ, ИК107BC3/66. Матеріал створений та наданий доктором біологічних наук, завідувачем лабораторії генетико-біотехнологічних методів селекції кукурудзи Селекційно-генетичного інституту – Національно-го центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН України Белоусовим А. О.

У дослідах використовували неушкоджені зернівки кукурудзи, які пророщували впродовж трьох діб на фільтрувальному папері в термостаті при температурі 25 °С за відносної вологості повітря 60 %. Водний дефіцит (ВД) створювали, розміщуючи проростки в камері з відотною вологістю повітря 35–40 %. Гіпертермію (ГТ) створювали шляхом розміщення проростків в термостаті при 37 °С. Тривалість дії стресових факторів – 6 годин. Рослини контрольного варіанту протягом досліду перебували в умовах оптимального зволоження при температурі 25 °С. Після закінчення експозиції препаративні надземні частини проростків (НЧП), ендосперм і коріння заморожували при температурі -70 °С. Активність лектинів визначали за їх здатністю аглютинувати трипсинізовані еритроцити білих щурів за кімнатної температури. За активність приймали величину, зворотну мінімальній концентрації білка, за якої відбувається аглютинація еритроцитів 1/(мкг білка/мл) [5]. Афінну хроматографію проводили з використанням колонки (Ø 1,0 x 15 см) з бромціанактивованою овомукоїд-сефарозою 4В (“Sigma”). Електрофорез проводили в 10 % ПААГ, що містив 0,1 % додецилсульфатнатрію при рН 8,3 за методом Laemmli [8]. Отримані матеріали пройшли математичне і статистичне опрацювання відповідно до загальноприйнятих методик [3]. Показники представлені у вигляді середнього значення та похибки, достовірність різниці результатів експериментів оцінювали з використанням *t*-критерію Ст’юдента. Відмінності між середніми значеннями вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Проведені дослідження дозволили встановити диференційовану зміну активності розчинних лектинів за дії стресових чинників, що вивчалися, в тканинах проростків посухостійких (244–281 % відносно контрольних значень) і непосухостійких ліній (39–79 % відносно контрольних значень) (табл. 1). Можна допустити, що високий рівень індукованого накопичення лектинів в тканинах проростків посухостійких ліній під дією стресових чинників може бути пов'язаний з більш високою швидкістю їх синтезу. Це припущення, без-

умовно, вимагає експериментального підтвердження і є завданням наших подальших досліджень.

Таблиця 1

Індукована зміна активності розчинних лектинів впроростках ліній кукурудзи з різним рівнем посухостійкості

Назва лінії	Активність лектинів, (мкг білка/мл) ⁻¹			
	контроль	водний дефіцит	гіпертермія	водний дефіцит + гіпертермія
Посухостійкі лінії				
ИК107 зМ	13,7±0,9	13,4 ±0,8	37,9±1,0*	33,5±3,0*
Од329	15,9 ±1,2	19,2±1,0*	44,5 ±2,0*	25,9 ± 0,9*
Непосухостійкі лінії				
ГК26 зМ	6,0 ± 0,4	4,6 ± 0,2*	2,4 ± 0,1*	2,2±0,2*
ИК107BC ₃ /66	5,3 ±0,1	3,5±0,1*	5,9 ±0,3	2,5±0,1*

Примітка: * – достовірно порівняно з контролем, $p \leq 0,05$

З використанням методів висолювання сульфатом амонію, діалізу та афінної хроматографії 4В були виділені та очищені розчинні лектини з 3-добових проростків кукурудзи.

Вихідна лектинова активність в екстрактах була 0,46–0,77 мкг / мл⁻¹. Після висолювання сульфатом амонію з наступним діалізом проти 0,2 М фосфатного буфера з рН 7,4, відбувалося концентрування білка і активність лектина збільшувалася в 10,4–16,8 рази.

Отримані після діалізу екстракти наносили на колонку з бромціанактивованою овомукоїд-сефарозою 4В (рис. 1). Елюцію білків проводили поступово такими розчинами: 1) 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,4, що містить 0,1 М NaCl, 2) 0,1 М оцтовою кислотою і 3) 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,4, що містить 0,1 М NaCl і 1% N-ацетилглюкозамин.

Лектини елюїрувались з колонки 2 піками: перший пік – 0,1 М оцтовою кислотою, і другий пік – 1 % N-ацетилглюкозаміном. Надалі очищенню піддавали білкову фракцію, елюїровану 1 % N-ацетилглюкозаміном, яка містила основну кількість лектину. Використання афінної хроматографії дозволило отримати препарат лектина, питома активність якого була в 16–30 разів вищою за його активність після висолювання сульфатом амонію. В результаті проведеного процесу очищення вихід розчинних лектинів контрольних рослин кукурудзи склав 26–30 % з коефіцієнтом очищення 322–428. Вихід розчинних лектинів рослин кукурудзи, що зазнали впливу водного дефіциту та гіпертермії склав 16–18 % з коефіцієнтом очищення 184–215.

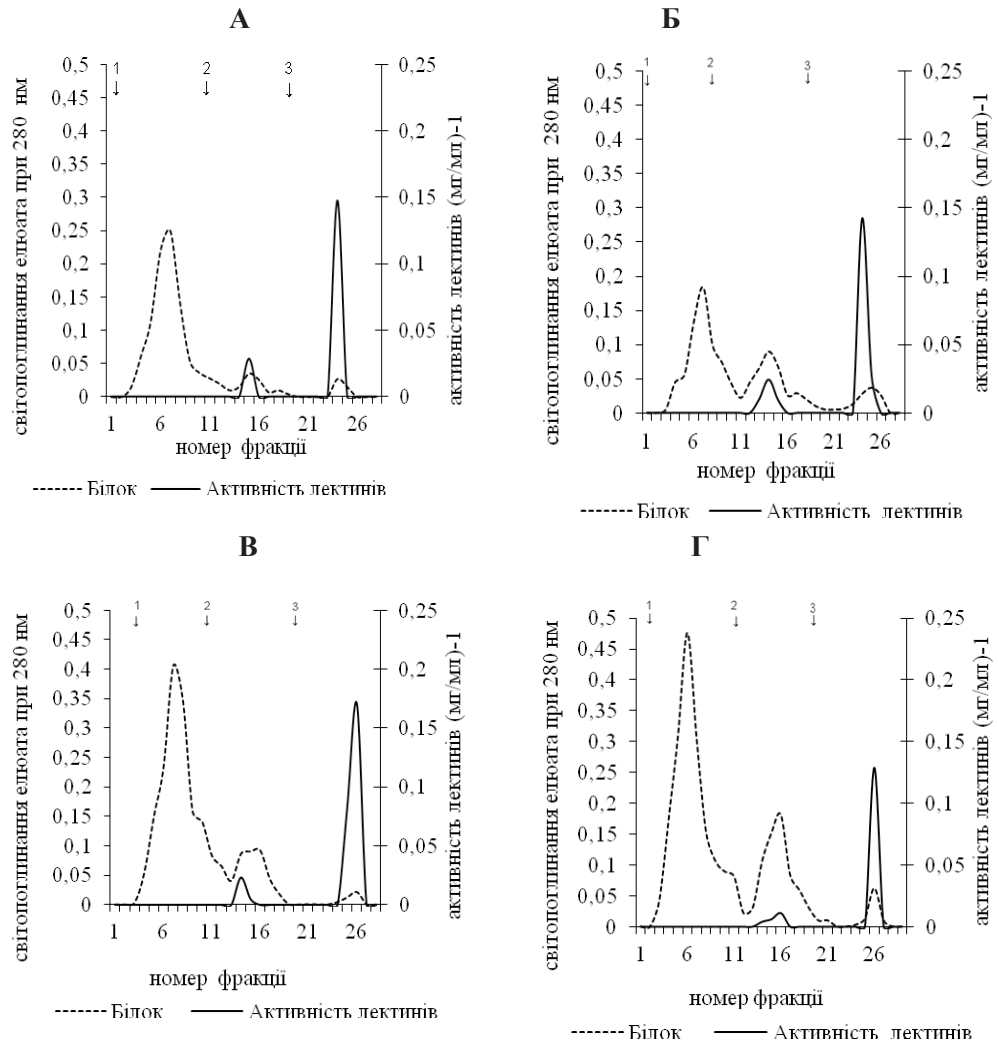


Рис. 1. Афинна хроматографія на бромціанактивованій овомукоїд-сефарозі 4В розчинних лектинів з проростків кукурудзи.

Примітка: а – посухостійка лінія (контроль), б – посухостійка лінія (вд+гт),
в – слабопосухостійка лінія (контроль), г – слабопосухостійка лінія (вд+гт)

Фракції, отримані після хроматографії, були використані для визначення активності лектинів та ліофільно висушені. Отримані ліофілізати надалі були використані для визначення вуглеводної специфічності та молекулярної маси виділених лектинів методом електрофорезу (рис. 2).

Дослідження виділених лектинів з використанням електрофорезу [10] в ПААГ з ДСНа показало, що молекулярна маса виділених розчинних лектинів знаходиться в області 50–60 кДа.

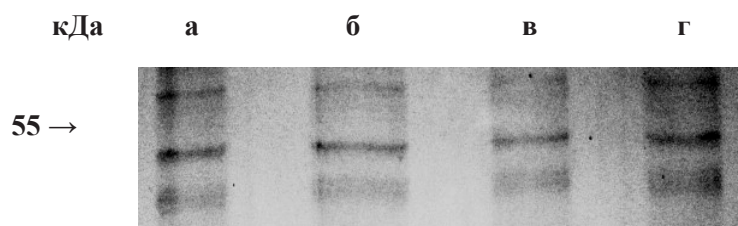


Рис. 2. Електрофорез розчинних лектинів в 10 % ПААГ з додаванням 0,1 % SDS при рН 8,3

Примітка: а – посухостійка лінія (контроль), б – посухостійка лінія (ВД+ГТ),
в – слабопосухостійка лінія (контроль), г – слабопосухостійка лінія (ВД+ГТ)

Наступним етапом досліджень було вивчення вуглеводної специфічності виділених лектинів. Лектини, виділені з контрольних рослин, відрізнялися високою спорідненістю до N-ацетилглюкозамін і D-фруктозо-6-фосфату і незначною спорідненістю до D-глюкози, D-фруктози і D-рафінози. Лектини, виділені з рослин, що зазнали впливу водного дефіциту і гіпертермії, відрізнялися від лектинів, виділених з контрольних рослин, зниженням в 2 рази спорідненості до N-ацетилглюкозаміну. Ці дані вказують на якісні зміни лектинових білків розчинної фракції за впливу водного дефіциту та гіпертермії.

Висновки

1. Встановлено підвищення активності розчинних лектинів в тканинах проростків посухостійких ліній (ИК107 зМ, Од329) до рівня 244–281 % відносно контрольних значень і зниження активності у непосухостійких ліній (ГК26зМ, ИК107ВС₃/66) до 39–79 % відносно контрольних значень.

2. З використанням методів висолювання сульфатом амонію, діалізу та афінної хроматографії були виділені та очищені розчинні лектини. Молекулярна маса виділених розчинних лектинів знаходиться в області 50–60 кДа. Виділені лектини мали високу спорідненість до N-ацетилглюкозаміну і D-фруктозо-6-фосфату.

Стаття надійшла до редакції 22.04.2021

Список використаної літератури

1. Адамовская В. Г. Активность нитратредуктазы и лектинов клеточных стенок у растений кукурузы, выращенных в условиях водного дефицита и теплового шока / В. Г. Адамовская, О. О. Молодченкова, А. А. Белоусов, В. М. Соколов, О. В. Тихонова, С. В. Попов, Л. Я. Безкровная, И. А. Якименко // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – № 4. – С. 330–338.
2. Бабоша А. В. Индуцибельные лектины и устойчивость растений к патогенным организмам и абиотическим стрессам / А. В. Бабоша // Биохимия. – 2008. – № 7. – С. 1007–1022.
3. Боровиков В. П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA / В. П. Боровиков. – М.: Горячая линия Телеком, 2013. – 288 с.

4. Гараева Л. Д. Лектины клеточной стенки при закаливании к холоду озимой пшеницы / Л. Д. Гараева, С. А. Позднеева, О. А. Тимофеева, Л. П. Хохлова // Физиология растений. – 2006. – № 6. – С. 845–850.
5. Луцик М. Д. Лектины / М. Д. Луцик, Е. Н. Панасюк, А. Д. Луцик. – Львів: Вища школа, 1981. – 158 с.
6. Маменко П. Н. Функции лектинов растений при абиотических и биотических стрессах / П.Н. Маменко // Физиология растений и генетика. – 2014. – № 2. – С. 95–107.
7. Молодченкова О. О. Возможная роль лектинов в формировании защитных механизмов зерновых культур к биотическим и абиотическим факторам / О. О. Молодченкова, В. Г. Адамовская, Л. Й. Цисельская, О. В. Тихонова, Ю. А. Левицкий // Геном растений: Мат-лыМеждунар. конф., г. Одесса, 13–16 октября 2008 г.– Одесса, 2008. – С. 94–95.
8. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
9. Lannoo N. Lectin domains at the frontiers of plant defense / N. Lannoo, E. J. VanDamme // Front. Plant Sci. – 2014. – Vol. 5. – P. 397–413.
10. Singh R. Isolation of lectin gene and development of resistant *Nicotianatabacum* L. against *Sporodopteralitura* / R. Singh, I. M. Tiwari, H. M. Jagadeesh et al. // Indian J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 11. – P. 134–141.

О. В. РищакOVA¹, О. О. Молодченкова¹, С. А. Петров²

¹Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, Овідіопольська дор., 3, Одеса, Україна,
e-mail:olgamolod@ukr.net

²Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, біологічний факультет, кафедра біохімії, вул. Дворянська, 2, Одеса, Україна,
e-mail: Serpet2015@ukr.net

БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОЗЧИННИХ ЛЕКТИНІВ КУКУРУДЗИ В УМОВАХ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ ТА ГІПЕРТЕРМІЇ

Резюме

Проблема. Реакція рослин на посуху і високу температуру включає взаємодію між різними молекулярними, фізіологічними і біохімічними процесами. Синтез ряду білків, присутніх за нормальних умов, включаючи лектини, збільшується разом із синтезом білків стресу в несприятливих умовах.

Мета. Метою нашого дослідження було виявлення змін активності і біохімічних характеристик розчинних лектинів в проростках кукурудзи з різною посухостійкістю в умовах водного та теплового стресу для створення нових біохімічних методів оцінки посухостійкості.

Методика. В дослідженнях використовували триденні проростки кукурудзи (*Zea mays* L.) з різним рівнем посухостійкості: посухостійкі лінії Од 329, ІК107 зМ, непосухостійкі лінії ГК 26, ІК107ВС3 / 66. Лектинову активність визначали на підставі їх здатності аглютинувати трипсинізовані еритроцити білих щурів. Електрофорез виконували в 10 % ПААГ за методом Леммлі.

Основні результати. Дослідження дозволило виявити підвищення активності розчинних лектинів (244–281 % від контрольного значення) за даних стресових чинників у посухостійких ліній і зниження активності розчинних лектинів (39–79 % від контрольного значення) у нестійких до посухи ліній. Методами висолювання сульфатом амонію, діалізу та афінної хроматографії були виділені та очищені розчинні лектини. Молекулярна маса виділених розчинних лектинів знаходиться в області 50–60 кДа. Виділенні лектини мали високу спорідненість до N-ацетилглюкозамін і D-фруктозо-6-фосфату.

Висновки. Встановлено, що лінії кукурудзи, які достовірно відрізняються за рівнем посухостійкості, характеризуються підвищеною активністю розчинних лектинів у стійких ліній і зниженням цього показника в тканинах нестійких до дії посухи ліній.

Ключові слова: *Zea mays* L.; розчинні лектини; водний дефіцит; гіпертермія; виділення та очищення.

O. V. Ryshchakova¹, O. O. Molodchenkova¹, S. A. Petrov²

¹Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seeds and Cultivar Investigation, 3, Ovidiopolska Road, Odesa, Ukraine,
e-mail:olgamolod@ukr.net

²Odesa National Mechnykov University, Faculty of Biology, Department of Biochemistry, 2, Dvorianska Str., Odesa, Ukraine,
e-mail: Serpet2015@ukr.net

BIOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF SOLUBLE LECTINS IN CORN UNDER THE IMPACT OF WATER DEFICIT AND HYPERTHERMIA

Abstract

Introduction. Drought and high temperature are two of the key factors of the environment limiting crop capacity of grains. Response of the plants to drought and high temperature is very complex and includes interaction between various molecular, physiological and biochemical processes. Synthesis of a number of proteins present under normal conditions, including lectins, increases along with synthesis of stress proteins under adverse conditions.

Aim. The goal of our study is to identify the changes in the activity and biochemical characteristics of soluble lectins in maize seedlings with different drought tolerance under water and heat stress in order to create new biochemical methods for assessing drought tolerance.

Methods. Three-day young sprouts of corn lines (*Zea mays* L.) with different levels of drought tolerance were used in the research: drought-tolerant lines Od 329, IK107 zM, non-drought-tolerant lines GK 26, IK107VS₃ / 66. Lectin activity was defined on the basis of their ability to agglutinate trypsinized erythrocytes of white rats. Electrophoresis was performed in 10 % PAGE following the Laemmli method.

Results. The study enabled us to identify increase in soluble lectin activity (244-281 % of the reference value) under the given stress factors in drought-tolerant lines, and decrease in soluble lectin activity (39 - 79 % of reference value) under the given stress factors in non-drought-tolerant lines. Soluble lectins were isolated and purified using salting out with ammonium sulfate, dialysis and affinity chromatography. The molecular weight of the isolated soluble lectins is in the range of 50-60 kDa. The isolated lectins had a high affinity for N-acetylglucosamine and D-fructose-6-phosphate.

Conclusion. Therefore, it has been established that corn lines with positively different levels of drought tolerance are characterized by varying activity of soluble lectins.

Key words: *Zea mays* L.; soluble lectins; water deficit; hyperthermia; isolation and purification.

References

1. Adamovskaya V. G., Molodchenkova O. O., Belousov A. A., Sokolov V. M., Tihonova O. V., Popov S. V., Bezkravnaya L. Ya., Yakimenko I. A. (2010) "Activity of nitrate reductase and cell wall lectins in maize plants grown under conditions of water deficiency and heat shock" ["Aktivnost nitratoreduktazyi i lektinov kletochnykh stenok u rasteniy kukuruzyi, vyirashchennykh v usloviyakh vodnogo defitsita i teplovogo shoka"], *Fiziologiya i biohimiya kult. Rasteniy*, 4, pp. 330–338.
2. Babosha A. V. (2008) "Inducible lectins and plant resistance to pathogenic organisms and abiotic stresses" ["Indutsibelnyielektinyi i ustoychivost rasteniy k patogennym organizmam i abioticheskim stressam"], *Biohimiya*, pp. 1007–1022.
3. Borovikov V. P. (2013) *A popular introduction to modern data analysis in STATISTICA* [Populyarnoe vvedenie v sovremennyi analiz daniy v sisteme STATISTICA], M.: Goryachaya liniya Telekom, 288 p.
4. Garaeva L. D., Pozdneeva S. A., Timofeeva O. A., Hohlova L. P. (2006) "Cell wall lectins during cold hardening of winter wheat" ["Lektinyi kletochnoy stenki pri zakalivani k holodu ozimoy pshenitsyi"], *Fiziologiya rasteniy*, 6, pp. 845–850.
5. Lutsik M. D., Panasyuk E. N., Lutsik A. D. (1981) *Lectini* [Lektini], Lviv: Vischa shkola, 158 p.
6. Mamenko P. N. (2014) *Functions of plant lectins under abiotic and biotic stresses* ["Funktsii lektinov rasteniy pri abioticheskikh i bioticheskikh stressah"], *Fiziologiya rasteniy i genetika*, 2, pp. 95–107.
7. Molodchenkova O. O., Adamovskaya V. G., Tsiselskaya L. Y., Tihonova O. V., Levitskiy Yu. A. (2008) "Possible role of lectins in the formation of defense mechanisms of grain crops against biotic and abiotic factors" ["Vozmozhnaya rol lektinov v formirovani zaschitnykh mekhanizmov zernovykh kultur k bioticheskim i abioticheskim faktoram"], *Genom rasteniy: Mat-lyi Mezhdunar. konf.*, g. Odessa, 13–16 oktyabrya 2008, Odessa, pp. 94–95.
8. Osterman L. A. (1981) *Research methods of proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation* [Metodyi issledovaniya belkov i nukleinovyykh kislot: Elektroforez i ultratsentrifugirovaniye], M.: Nauka, p. 288.
9. Lannoo N., VanDamme E. J. (2014) "Lectin domains at the frontiers of plant defense", *Front. Plant Sci*, 5, pp. 397–413.
10. Singh R., Tiwari I. M., Jagadeesh H. M. (2012) "Isolation of lectin gene and development of resistant *Nicotianatabacum* L. against *Sporodopteralitura*", *Indian J. Biotechnol*, 11, pp. 134–141.