

УДК 58.071

АКТИВНОСТЬ ЛЕКТИНОВЫХ БЕЛКОВ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ, ИНФИЦИРОВАННЫХ МИКРОМИЦЕТАМИ

© 2016 Ю.Ю. Невмержицкая, Г.Х. Шаймуллина, О.А. Тимофеева

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Статья поступила в редакцию 24.05.2016

В исследовании проведено инфицирование растений яровой пшеницы сорта Омская 33 возбудителем фузариозной корневой гнили *Fusarium (F.) oxysporum Schlechtend.:Fr.* и сапрофитным плесневым грибом *Aspergillus niger*. Семена инокулировали в суспензии спор фитопатогенов ($1 \cdot 10^4$ КОЕ/см³) в течение суток перед посадкой. Индекс развития заболевания и длину проростков оценивали на 14 день после посадки растений. Содержание малонового диальдегида (МДА), активность растворимых и связанных с клеточной стенкой лектинов, каталазы, аскорбатпероксидазы и растворимой пероксидазы оценивали на 7 сутки после инфицирования. Установлено, что *F.oxysporum* повышал активность лектинов клеточной стенки, но оба патогена ингибировали активность растворимых лектинов и длину корней проростков. При этом уровень МДА, активность аскорбатпероксидазы и растворимой пероксидазы увеличивались у растений, инфицированных *F. oxysporum*, *A. niger* повышал активность каталазы. По-видимому, в зависимости от специализации фитопатогена растения активируют различные сигнальные системы, необходимые для формирования защитных реакций.

Ключевые слова: яровая пшеница, фитопатоген, лектин, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты

Заболевания, вызываемые грибными фитопатогенами, приводят к потерям урожая и снижают качество сельскохозяйственной продукции. Большое значение приобретает изучение молекулярных механизмов формирования устойчивости растений к различным заболеваниям, в частности, к таким, как фузариоз. Глобальное потепление климата и неудовлетворительные условия хранения зерна ведут к его заражению аспергиллами и загрязнению зерна афлотоксинами.

Известно, что классический лектин – агглютинин зародыша пшеницы проявляет высокую специфичность к N-ацетилглюкозамину и олигомерам хитина, что свидетельствует о его защитной роли при заражении растений хитинсодержащими фитопатогенами [1]. Межклеточное узнавание, очевидно, является первым этапом взаимоотношения растения-хозяина и микроорганизма, и роль рецепторов в распознавании чужеродных инфекционных структур могут выполнять лектины, связанные с клеточной стенкой [2]. С другой стороны, патогенез растений сопровождается усилением окислительных процессов, которые имеют большое значение для реализации защитных реакций [3]. Образующиеся активные формы кислорода могут влиять на метаболические процессы как растения, так и фитопатогена. Однако у устойчивых растений окислительные процессы могут компенсироваться за счет большего содержания антиоксидантов. Механизмы устойчивости растений к специфическим и неспецифическим фитопатогенам представляют собой сложные и недостаточно изученные процессы.

Цель работы: выяснение влияния инфицирования специфическим и неспецифическим фитопатогенами на про- и антиоксидантный статус растений яровой пшеницы.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования являлись проростки яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Омская 33. Семена

стерилизовали 70% этиловым спиртом, промывали стерильной дистиллированной водой и инокулировали в суспензии спор фитопатогенов ($1 \cdot 10^4$ КОЕ/см³) в течение суток. Инфекционными агентами служили возбудитель фузариозной корневой гнили *Fusarium (F.) oxysporum Schlechtend.:Fr.* и сапрофитный плесневый гриб *Aspergillus niger*. Грибы были выделены из семян пшеницы, районированных для Республики Татарстан сортов и селекционных линий. После инфицирования семена выращивали в кюветах на водопроводной воде при искусственном освещении с 12-ти часовым фото-периодом в течение 7 и 14 суток. Контрольные растения росли на водопроводной воде. Корни 7-суточных проростков использовали для определения содержания малонового диальдегида, активности лектиновых белков и антиоксидантных ферментов. Индекс развития заболевания [4] и длину корней листьев определяли на 14 сут после инфицирования.

Растворимые лектины экстрагировали 0,05н HCl, лектины клеточной стенки – 0,05% раствором тритона-X-100 по методу, описанному в работе [5]. Для определения количества белка использовали метод Bradford [6]. Лектиновую активность рассчитывали по минимальному количеству белка, вызывающему агглютинацию эритроцитов (мкг белка/мл)⁻¹ [7]. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по накоплению его продукта – малонового диальдегида (МДА) [8]. Активность растворимой пероксидазы определяли по методу [9], аскорбатпероксидазы – по методу [10], каталазы по методу [11]. Попыты были проведены в трех биологических повторностях. Результаты опытов представлены на рисунках и в таблицах как средние арифметические и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение. Выбор фитопатогенов для исследования был обусловлен их специализацией, то есть приуроченностью к определенному питательному субстрату – грибы рода *Fusarium spp.* (*F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. moniliforme*) являются возбудителями корневой фузариозной гнили пшеницы, тогда как *A.niger* – это возбудитель черной плесневидной гнили лука и чеснока [12]. У растений, инфицированных *F. oxysporum*, наблюдали загнивание корней, побурение оснований стеблей проростков. Индекс развития заболевания у растений этого варианта

Невмержицкая Юлия Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений. E-mail: nsh76@mail.ru

Шаймуллина Гульназ Хидиятовна, аспирантка

Тимофеева Ольга Арнольдовна, доктор биологических наук, профессор кафедры ботаники и физиологии растений. E-mail: Olga.Timofeeva@kpfu.ru

составил 62%. При заражении *A. niger* видимых изменений у выросших растений не наблюдалось, тогда как погибшие проростки загнили и были покрыты грибницей с черными спорами. Инфицирование семян *F. oxysporum* привело к снижению всхожести до 26%, *A. niger* – до 50%, тогда как в контрольном варианте всхожесть составила 97%. Изучение длины проростков показало, что фитопатогенные грибы не влияли на высоту листьев, но значительно ингибировали рост корней проростков пшеницы (рис.1).

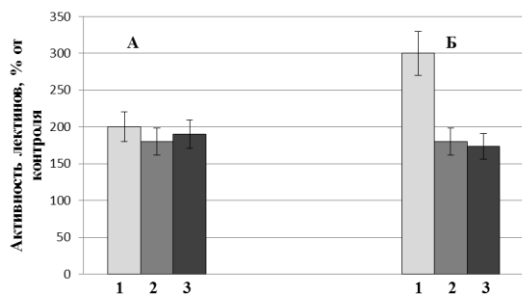


Рис. 1. Длина листьев (А) и корней (Б) 7-ми суточных проростков яровой пшеницы Омская 33 при инфицировании фитопатогенами: 1 – контроль; 2 - *F. oxysporum*, 3 - *A. niger*

В следующей части нашей работы мы исследовали изменения активности лектиновых белков, вызванные инфицированием фитопатогенов. Лектины – это особый класс белков, обладающих способностью обратимо и специфически связываться с углеводными остатками различной химической природы. Поскольку в состав клеточных стенок фитопатогенов входят углеводные компоненты, то это свойство лектинов может обеспечивать растениям способность распознавать целый ряд фитопатогенов даже по слабым различиям в углеводной структуре поверхностей микроорганизмов, что позволяет рассматривать лектины, входящие в состав клеточных стенок, в качестве рецепторов в межклеточных взаимодействиях с фитопатогенами. В наших экспериментах активность растворимых лектинов снижалась под влиянием как специфического фитопатогена *F. oxysporum*, так и неспецифического *A. niger*, при этом ингибирующий эффект *F. oxysporum* на активность растворимых лектинов был выражен сильнее по сравнению с *A. niger* (рис. 2). Активность лектинов клеточной стенки значительно возросла под влиянием *F. oxysporum*, тогда как в варианте с *A. niger* активность лектинов клеточной стенки была как у контрольных растений (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют об участии лектинов в процессе взаимодействия клеток со специфическими и неспецифическими патогенами.

Известно, что лектины, выделенные из различных растений, способны специфически взаимодействовать с различными структурами грибных и бактериальных клеток: *Phytophthora infestans*, *P. megasperma* var. *sojiae*, *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, *Verticillium dahliae*, *Helminthosporium sativum*, *Ustilago tritici*, *Tilletia tritici*, *Ceratocystis fimbriata*, *Trichoderma viride*, *Fusarium solani*, *Argobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas solanacearum*. В системе картофель - *Phytophthora infestans* взаимодействие между лектинами и патогенными грибами осуществляется по принципу рецептор-лиганд. При этом растительный гликопротеин выполняет функции рецептора, который взаимодействует с лигандом фитопатогена с образованием межклеточного контакта,

запускающего реакцию сверхчувствительности клеток [13]. На основании полученных нами данных об ответной реакции активности лектинов на инфицирование, можно предположить, что растения яровой пшеницы сорта Омская 33 обладают большей чувствительностью к *F. oxysporum* по сравнению с грибом *A. niger*. Это подтверждают результаты экспериментов по определению влияния микромицетов на интенсивность ПОЛ мембран (рис. 3).

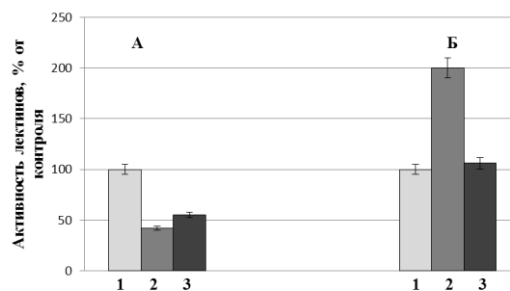


Рис. 2. Активность растворимых лектинов (А) и лектинов клеточной стенки (Б) в 7-ми суточных проростках яровой пшеницы сорта Омская 33 при инфицировании патогенными грибами: 1 – контроль; 2 - *F. oxysporum*, 3 - *A. niger*

Активация процесса ПОЛ мембран, вызванная усиленной генерацией активных форм кислорода (АФК), является одним из наиболее ранних эффектов, наблюдаемых у растений при воздействии различных стрессовых факторов, в том числе и инфицирования фитопатогенами [14]. Одним из относительно стабильных продуктов ПОЛ мембранных липидов в клетке выступает МДА, по накоплению которого можно судить о степени окислительного стресса [15]. Как видно из рис. 3 фитопатоген *F. oxysporum* повышает интенсивность образования МДА в корнях яровой пшеницы, тогда как *A. niger* не влиял на этот показатель.

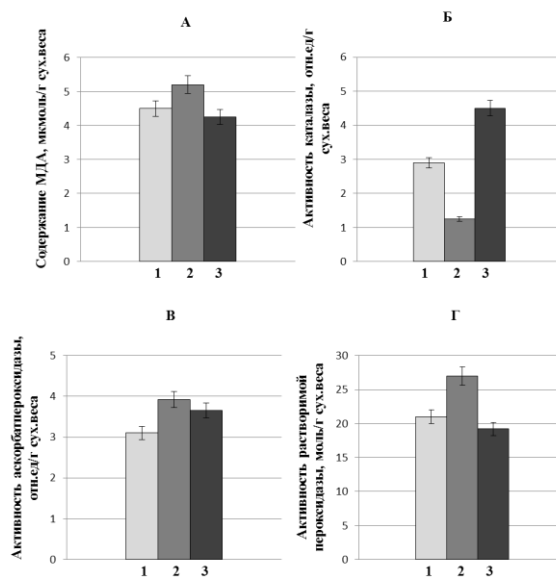


Рис. 3. Влияние фитопатогенов на содержание малонового диальдегида (А), активность каталазы (Б), аскорбатпероксидазы (В) и растворимой пероксидазы (Г) в корнях 7-ми суточных проростков яровой пшеницы сорта Омская 33: 1 – контроль; 2 - *F. oxysporum*, 3 - *A. niger*

Как известно, образующийся при патогенезе в клетках растений пероксид водорода H_2O_2 выполняет сигнальную и защитную функции [3]. В нейтрализации H_2O_2 участвуют различные антиоксидантные ферменты, в том числе каталаза и пероксидаза. Согласно нашим исследованиям в корнях проростков пшеницы увеличивалась активность каталазы при инфицировании *A. niger*, тогда как *F. oxysporum* снижал активность каталазы (рис. 3).

Известно, что патогены или элиситоры могут не только активировать, но и затормаживать экспрессию некоторых генов, например, каталазы и аскорбатпероксидазы [16]. В тоже время активация каталазы усиливает вирулентность патогена за счет снижения концентрации H_2O_2 и подавления окислительного взрыва [17]. Поддержание в клетках пшеницы определенного уровня H_2O_2 может быть одним из механизмов защиты от высокопатогенного возбудителя *F. oxysporum*. С другой стороны, согласно сведениям литературы, в компенсаторном механизме антиоксидантной защиты большое значение отводится аскорбатпероксидазе [18], и эффективная защита от АФК осуществляется только при сопутствующем увеличении активности каталазы и аскорбатпероксидазы [19]. В наших экспериментах в ответ на инфицирование как *A. niger*, так и *F. oxysporum* (рис. 3). Активность аскорбатпероксидазы значительно увеличилась, причем в большей степени под влиянием *F. oxysporum*. Следует отметить, что недостаток активности каталазы часто компенсируется возрастанием активности аскорбатпероксидазы [20], что, вероятно, мы и наблюдаем при инфицировании растений *F. oxysporum*. В ответ на заражение микромицетами активность растворимой пероксидазы возрастала только под влиянием *F. oxysporum* (рис. 3). Нужно отметить, что активирование пероксидазы под влиянием возбудителя заболевания является характерной ответной биохимической реакцией растений, по которой можно судить об устойчивости растений. Однако повышенная пероксидазная активность не всегда коррелирует с устойчивостью и не всегда её индуцирует.

Таким образом, мы установили, что *F. oxysporum* вызывает окислительный взрыв в клетках корней проростков пшеницы, в тушении которого принимают участие пероксидазы. Пероксидазы стимулируют процессы лигнификации и суберинизации клеточных стенок в процессе патогенеза [20], что может являться одним из механизмов защиты от специфических патогенов. В ответ на заражение неспецифическим инфекционным микромицетом *A. niger* в клетках корней пшеницы не изменялось содержание продуктов ПОЛ, активировалась каталаза и аскорбатпероксидаза. По-видимому, в зависимости от специализации фитопатогена растения активируют различные сигнальные системы, необходимые для формирования защитных реакций.

Выводы: установлено, что инфицирование проростков пшеницы фитопатогенными грибами *Fusarium spp.* и *Aspergillus niger* вызывает различную реакцию антиоксидантной системы защиты растений. В нейтрализации окислительного стресса, вызванного грибом *Aspergillus niger*, преимущественно участвуют ферменты аскорбатпероксидаза и каталаза, тогда как защиту от АФК в случае заражения *Fusarium spp.* осуществляют пероксидазы.

Работа была выполнена в рамках выполнения «Плана мероприятий по реализации программы повышения конкурентоспособности ФГАОУ ВПО «КФУ» среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2013–2020 г».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Mirelman, D.E. Inhibition of Fungal Growth by Wheat Germ Agglutinin / D.E. Mirelman, E. Galun, N. Sharon et al. // Nature. 1975. V. 256. P. 414–416.
2. Toyoda, H. Resistance mechanism of cultured plant cells to tobacco mosaic virus (TMV) Resistance of calli, protoplasts, cotyledons, leaf discs and intact leaves of tomato plants / H. Toyoda, M. Yamamoto // Ann. Phytopath. Soc. Japan. 1983. V. 49. P. 639–646.
3. Neil, S.J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants / S.J. Neill, R. Desikan, A. Clarke et al. // Journal of Experimental Botany. 2002. V. 53. P. 1237–1247.
4. Деминцева, М.И. Фитопатология. – М.: Агропромиздат, 1985. 397 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 и др. // Физиология растений. 1999. Т.46. № 2. С.181–186.
6. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
7. Lutsik, M.D. Lektiny (Lectins) / M.D. Lutsik, E.N. Panasyuk, A.D. Lutsik // Lvov: Vishcha Shk, 1981. 156 p.
8. Kumar, G.N. Changes in lipid peroxidation and lipolitic and freeradical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers / G.N. Kumar, N.R. Knowles // Plant. Physiol. 1993. V. 102. P. 115–124.
9. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош и др. – Л.: Агропромиздат, 1987. С. 41–45.
10. Nakano, Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // Plant Cell Physiol. 1981. V. 22. P. 867–880.
11. Лукаткин, А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодого повреждения в листьях теплолюбивых растений. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 697–702.
12. Шкалик, В.А. Защита растений от болезней / В.А. Шкалик, О.О. Белошапкина, Д.Д. Букреев и др. – М.: Колос, 2004. 255 с.
13. Molodchenkova, O.O. Lectins and defense reactions of plants / O.O. Molodchenkova, V.G. Adamovskaya // Bulletin of the Kharkov National Agrarian University, series Biology. 2014. V. 1. № 31. P. 30–46.
14. Курганова, Л.Н. Перекисное окисление липидов антиоксидантная система защиты в хлоропластах гороха при тепловом шоке / Л.Н. Курганова, А.П. Веселов, Т.А. Гончарова, Ю.В. Синицына // Физиология растений. 1997. Т. 44. № 5. С. 725–735.
15. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Science. 2002. V. 7 (9). P. 405–410.
16. Mittler, R. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate oxidase expression durin pathogen-induced programmed cell death in tobacco / R. Mittler, M. Cohen // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 461–473.
17. Яруллина, Л.Г. Салициловая и жасмоновая кислоты в регуляции про-антиоксидантного статуса листьев пшеницы при инфицировании *Septoria nodorum* Berk. / Л.Г. Яруллина, Н.Б. Трошина, Е.А. Черепанова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т.47. № 5. С.602–608.
18. Apel, K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 373–399.
19. Pastori, G.M. Post-transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione protein and activity in the bundle sheath cells of maize / G.M. Pastori, P.M. Mullineaux, C.H. Foyer // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 667–676.
20. Willekens, H. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C3 plants / H. Willekens, S. Chammongpol // EMBO J. 1997. V. 16. P. 4806–4816.
21. Almagro, L. Class III peroxidases in plant defence reactions / L. Almagro, L. V.G. Ros, S. Belchi-Navarro / J. Experim. Botany. 2009. V. 60(2). P. 377–390.

ACTIVITY OF LECTIN PROTEINS AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE WHEAT GERMS, INFECTED WITH MICROMYCETES

© 2016 Yu.Yu. Nevmerzhitskaya, G.H. Shaymullina, O.A. Timofeeva

Kazan (Volga) Federal University

In the research presented data of infection contamination of spring wheat plants Omskaya 33 variety by *Fusarium* root rot pathogen *Fusarium (F.) oxysporum* Schlectend.:Fr. and saprophytic molds *Aspergillus niger*. The seeds were inoculated in suspension with spores of phytopathogens ($1 \cdot 10^4$ CFU / cm³) within one day. The disease development index and the length of germs was assessed in 14 days after planting. The content of malondialdehyde (MDA), activity of soluble lectins and cell wall lectins, catalase, ascorbate-peroxidase and soluble peroxidase was evaluated in 7 days post infection. It is found that *F. oxysporum* increased the activity of cell wall lectins but both pathogens inhibited the activity of soluble lectins and length of roots germs. The level of MDA, activity of ascorbate-peroxidase and soluble peroxidase increased in plants infected with *F. oxysporum*; *A. niger* increased the activity of catalase. It appears that, depending on the phytopathogen specialization plants activate different signaling systems necessary for the formation of protective responses.

Key words: *spring wheat, phytopathogens, lectin, lipid peroxidation, antioxidant enzymes*

*Yuliya Nevmerzhitskaya, Candidate of Biology, Associate Professor
at the Department of Botany and Plants Physiology. E-mail:
nuu76@mail.ru*

*Gulnaz Shaymullina, Post-graduate Student
Olga Timofeeva, Doctor of Biology, Professor at the Department of
Botany and Plants Physiology. E-mail: Olga.Timofeeva@kpfu.ru*