

ЗМІНА ХАРАКТЕРИСТИК ЛЕКТИНОПОДІБНИХ БІЛКІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО В ОНТОГЕНЕЗИ

Г. Левчук, О. Войтович, В. Лях

Запорізький національний університет
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя 69063, Україна
e-mail: genetika@znu.edu.ua

Досліджена динаміка кількісних і якісних характеристик лектиноподібних білків вегетативних органів льону олійного різних генотипів упродовж вегетації. Встановлено, що обидва показники залежать як від стадії розвитку, так і від органної належності, однак зв'язок з першим фактором є значно сильнішим. Спостерігається також залежність рівня лектинової активності від органної належності: на початкових етапах найактивнішими є білки коренів, а починаючи зі стадії бутонізації – білки листків.

Ключові слова: *Linum humile* L., лектини, органна належність, лектинова активність, вуглеводнева специфічність.

Лектинами називають білки або глікопротеїни, які здатні розпізнавати і зворотно зв'язувати вуглеводи, розташовані на клітинних поверхнях. У зв'язку з цим вони є універсальними молекулами та містяться у всіх організмах, де беруть безпосередню участь у процесах внутрі- та міжклітинного розпізнавання. Так, за дії різноманітних чинників вуглеводи клітинних поверхонь постійно змінюються, і на цю зміну миттєво реагують лектини, зв'язуючись із новими вуглеводами. Конформація лектинів при цьому змінюється, інформація про неї надходить у геном і рослина таким чином реагує на зміни та пристосовується до них. Тому лектини можуть координувати фізіологічні процеси у динамічних умовах оточуючого середовища [3, 9].

Однак існуючі дані щодо фізіологічної ролі лектинів у рослинному організмі стосуються переважно родин злакових і бобових як модельних об'єктів одно- та дводольних рослин. Крім того, досліджена фізіологічна роль лектинів лише в окремих процесах. Так, у бобових вивчають участь лектинів у процесах утворення та функціонування симбіотичних комплексів [11, 13], а у злакових – участь лектинів у формуванні стійкості до абіотичних і біотичних стресових факторів [14]. Комплексних досліджень, які б стосувалися ролі лектинів у різноманітних фізіологічних процесах у межах одного таксону, немає.

Льон олійний (*Linum humile* Mill.) є важливою промисловою, лікарською та олійною культурою, яка екологічно доволі пластична – добре себе почуває у різних кліматичних зонах і дає досить високий врожай [10]. Зважаючи на широке застосування цієї культури і цінну олію, яка активно використовується у харчуванні, медицині та промисловості, важливим є її дослідження у фізіолого-біохімічному аспекті, зокрема виявлення й вивчення лектиноподібних властивостей цієї культури. Крім того, дослідження особливостей лектинів льону олійного впродовж онтогенезу розширить уявлення про фізіологічну роль лектинів у рослин в цілому.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження слугували такі генотипи льону олійного: К-7811, СІ-1655, Байкал, К-6776, К-7099, К-6080, К-1176, К-6686, К-7354, Південна ніч, К-7276, К-8085 та

К-7481. Рослинний матеріал відбирали в польових умовах упродовж онтогенезу, а саме відповідно до таких стадій розвитку: проростки, «ялинка», бутонізація та цвітіння.

У лабораторних умовах від рослин відокремлювали органи (корені, стебла та листя), з яких за стандартними методиками з модифікаціями (змінений склад екстракційного буферного розчину) екстрагували лектиноподібні білки [1, 4, 8].

Біологічну активність екстрактів лектинів характеризували за двома параметрами: **кількісним** (коефіцієнт лектинової активності) і **якісним** (вуглеводнева специфічність).

Активність лектинів визначали за допомогою реакції гемаглютинації з 2% суспензією трипсинизованих еритроцитів кроля [1, 2] з урахуванням концентрації білка. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за методом Варбурга-Крістіана [15]. Лектинову активність (ЛА) (мкг/мл) виражали як обернену величину – коефіцієнт лектинової активності (1/ЛА) (мкг/мл)⁻¹. На графіках дані 1E+09 означають 1×10⁹ (мкг/мл)⁻¹.

Вуглеводневу специфічність визначали за допомогою обліку пригнічення розчинами вуглеводів реакції гемаглютинації. Використовували 0,6 М розчини таких вуглеводів: глюкоза, галактоза, маноза, ксилоза, арабіноза, мальтоза, сахароза, лактоза, фруктоза та глюкозамін [9]. Вуглеводневу специфічність фіксували як позитивну у лектинів, виділених з окремого органа рослини льону на конкретній стадії розвитку, якщо вона спостерігалася у 80% зразків.

Результати і їхнє обговорення

Лектини були виділені з вегетативної маси льону олійного різних генотипів. При цьому видно (рис. 1), що у всіх досліджених генотипів максимальна лектинова активність спостерігалася на стадії «ялинки», а мінімальна – на стадії бутонізації. Так, залежно від генотипу, коефіцієнт лектинової активності на стадії проростків коливався від 3,68×10⁴ до 3,87×10⁶ (мкг/мл)⁻¹, на стадії «ялинки» – від 4,23×10⁶ до 3,53×10⁹ (мкг/мл)⁻¹. При переході до стадії бутонізації цей показник значно знижувався та становив близько 0,0057 до 0,31 (мкг/мл)⁻¹, а на стадії цвітіння знову підвищувався та становив від 12,46 до 128,99 (мкг/мл)⁻¹.

Характер змін лектинової активності протягом онтогенезу в різних генотипів є дуже схожим, однак за абсолютними показниками можна розрізнити групи. Так, високолектиновими виявилися генотипи К-6686, К-1176, К-8085 та К-7354, низьколектиновими – К-6776, К-7099, К-6080 та К-7481. Інші 5 генотипів (К-7811, СІ-1655, Байкал, Південна ніч та К-7276) ми віднесли до середньолектинових.

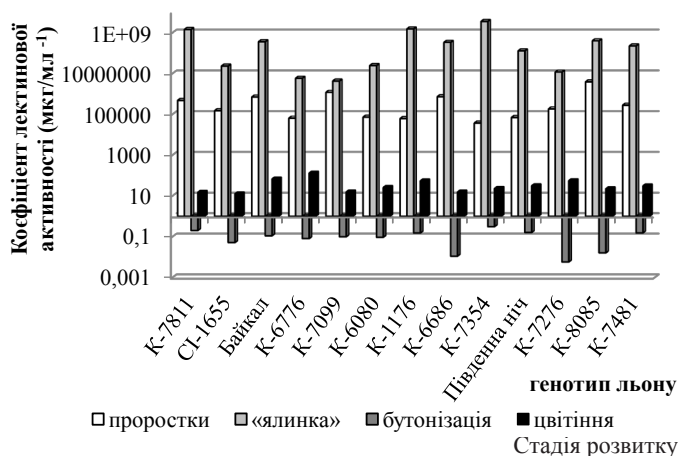


Рис. 1. Динаміка лектинової активності льону олійного протягом вегетації залежно від генотипу.

Для з'ясування загальної картини змін було визначено середню лектинову активність усіх генотипів (рис. 2). На початковому етапі онтогенезу (стадія проростків) коефіцієнт лектинової активності становив у середньому $1,83 \times 10^5$ (мкг/мл)⁻¹, на стадії «ялинка» він збільшився до $5,22 \times 10^8$ (мкг/мл)⁻¹. При переході до генеративного етапу онтогенезу (стадія бутонізації) коефіцієнт лектинової активності різко знижувався і становив $1,11 \times 10^{-1}$ (мкг/мл)⁻¹, а на стадії цвітіння дещо збільшувався та сягав рівня $3,80 \times 10^1$ (мкг/мл)⁻¹.

Зміни лектинової активності відповідають змінам пріоритетних фізіологічних процесів. Так, максимальний коефіцієнт лектинової активності спостерігається на початкових етапах розвитку (стадіях проростків і «ялинка»), в період так званого «повільного росту» [7], коли в рослин льону відбувається поділ клітин і їх диференціація, а саме в цих процесах лектини беруть активну участь [5].



Рис. 2. Зміна середнього коефіцієнту лектинової активності протягом вегетації.

Зі стадії бутонізації у рослин льону починається період «швидкого росту», коли поділ і диференціювання клітин практично припиняються, а уже існуючі тільки збільшуються в розмірах. Основна кількість лектиноподібних білків на стадії бутонізації сконцентрована в зачатках бутонів, а не у вегетативних органах, загальна лектинова активність останніх є найменшою. Збільшення активності лектинів при переході у стадію цвітіння можна пояснити їх безпосередньою участю у процесах розпізнавання маточкою пилку і запліднення [11, 13].

Враховуючи наявне функціональне диференціювання рослин на органи, було визначено рівень лектинової активності окремо коренів, листя та стебла.

На початкових етапах онтогенезу (стадії проростків та «ялинка») доміантним за розмірами, швидкістю росту й фізіологічною роллю з усіх органів є коренева система, а надземна частина у цей період росте дуже повільно. На подальших стадіях онтогенезу (період «швидкого росту») починає активно рости і розвиватися надземна частина, особливо збільшується кількість листків, а коренева система при цьому гальмується у рості й основним за функціонуванням органом у цей період (стадії бутонізації та цвітіння) є листки, розмір яких збільшується у декілька разів. Стебло у льону олійного є органом, який росте і розвивається найповільніше. Так, на стадії проростків сходів його ще немає, на стадії «ялинка» він з'являється, але росте дуже повільно, що зберігається і на стадії бутонізації, коли проходить остаточна диференціація провідної системи стебла. Зі стадії цвітіння фізіологічна роль стебла збільшується та його ріст значно пришвидшується. Але

вирішальну роль стебло має на стадії дозрівання, коли листя починає відмирати і стебло, окрім провідної, виконує асиміляційну функцію [7, 10, 12].

У зв'язку з цим нами був проаналізований коефіцієнт активності виділених лектиноподібних білків різної органної належності (рис. 3). Дані представлені у формі частки лектинової активності певного органа від загальної для всієї рослини.

Виявлена певна залежність лектинової активності від органа виділення. Так, на початкових стадіях вегетації (проростки та «ялінка») домінують корінь, рівень лектинової активності якого становить приблизно 80% від лектинової активності усєї рослини. Ще можна пояснити фізіологічним домінуванням у цей період саме цього органа. У цей період у кореневій системі переважають процеси поділу клітин і диференціації, а загальновідомим є той факт, що лектини безпосередньо берть участь у цих процесах [5].

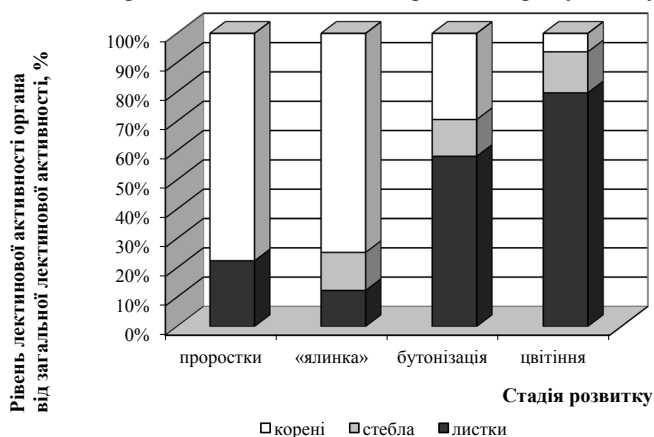


Рис. 3. Коефіцієнт активності лектинів різної органної належності, %.

При переході до етапу «швидкого росту» (стадії бутонізації та цвітіння) за рівнем лектинової активності домінують листки, де вона становить 50 і 80% від загальної лектинової активності рослини відповідно. У цей період основним фізіологічним процесом у рослині є фотосинтез, а відповідно до цього домінують листя. Алексидзе зі співавторами [2] була доведена участь лектинів у цьому найважливішому для рослин фізіологічному процесі. Висунуто гіпотезу, що лектини тилакоїдної мембрани разом із пігментами утворюють пігмент-лектиновий комплекс, роль лектинів якого полягає у зв'язуванні розчинних у стромі ферментів темної стадії фотосинтезу.

Вклад стебла у рівень лектинової активності є мінімальним і майже не змінюється протягом онтогенезу. Так, на стадіях «ялінки» та бутонізації відбуваються диференціація стебла й утворення провідної системи, у той же час рівень лектинової активності на цих етапах онтогенезу становить приблизно 10%. При переході на стадію цвітіння його вклад у загальний рівень лектинової активності збільшується до 15%. Це може бути пов'язано із закінченням диференціації провідної системи та переважання у стеблі на цьому етапі функції проведення води та поживних речовин. Крім того, у зв'язку зі збільшенням фотосинтетичної активності листя збільшується і кількість утворених органічних речовин, які потрібно транспортувати до місць потреби, тому і збільшується навантаження на флоему. Відомо, що лектини завдяки їх вуглеводозв'язуючим властивостям беруть безпосередню участь у транспорті поживних речовин по флоемі [6, 11, 13].

У зв'язку з тим, що впродовж розвитку змінюється набір вуглеводів на клітинних поверхнях, суттєве значення для розвитку рослин льону має не лише кількісний показник

лектинів – їх активність, а й якісний – здатність розпізнавати певні вуглеводи – вуглеводнева специфічність.

Упродовж вегетації фіксували зміни вуглеводневої специфічності, які були залежними від стадії онтогенезу, органа виділення та генотипу. Так, на стадії проростків лектини переважної більшості сортозразків незалежно від органної належності, були здатні розпізнавати манозу та глюкозамін, однак у лектинів листя на цій стадії спостерігалася наявність специфічності і до мальтози (див. таблицю).

На стадії «ялинка» спектр вуглеводневої специфічності лектинів дещо змінювався – незалежно від генотипу й органної належності вони були здатні розпізнавати манозу. Однак залежно від органа виділення спостерігалася додаткова специфічність: у лектинів листя – до галактози та мальтози, у лектинів коренів – до глюкозаміну, а у лектинів стебла – до галактози (див. таблицю).

На стадії бутонізації спектр вуглеводневої специфічності суттєво змінюється: лектини здатні розпізнавати галактозу, глюкозу, арабінозу та фруктозу, однак лектини листя здатні ще додатково розпізнавати мальтозу, а лектини коренів – глюкозамін.

При переході на стадію цвітіння – спектр вуглеводневої специфічності дещо змінюється – усі лектини здатні розпізнавати і зв'язувати арабінозу та глюкозамін. На цій стадії лектини стебла здатні також розпізнавати ще й галактозу, а листя – мальтозу (див. таблицю).

Вуглеводнева специфічність лектиноподібних білків вегетативних органів
льону олійного впродовж вегетації

Органна належність	Стадії розвитку			
	проростки	«ялинка»	бутонізація	цвітіння
корені	маноза, глюкозамін	маноза, глюкозамін	галактоза, глюкоза, арабіноза, фруктоза, глюкозамін	арабіноза, глюкозамін
стебла	–	маноза, галактоза	галактоза, глюкоза, арабіноза, фруктоза	арабіноза, глюкозамін, галактоза
листя	маноза, глюкозамін, мальтоза	маноза, галактоза, мальтоза	галактоза, глюкоза, арабіноза, фруктоза, мальтоза	арабіноза, глюкозамін, мальтоза

Отже, зміни вуглеводневої специфічності протягом онтогенезу є залежними від стадії розвитку: на стадії сходів спостерігається специфічність до манози та глюкозаміну, на стадії «ялинка» – до манози, на стадії бутонізації – до галактози, глюкози, арабінози та фруктози, а на стадії цвітіння – до арабінози та глюкозаміну. Крім того, спостерігається залежність спектра вуглеводневої специфічності від органа виділення. Так, окрім вуглеводневої специфічності, притаманної окремій стадії розвитку, було виявлено, що усі лектини листя проявляють специфічність до мальтози, лектини стебла – до галактози, а коренів – до глюкозаміну (див. таблицю).

Наявність вуглеводневої специфічності до манози на початкових етапах розвитку (стадії сходів і «ялинка») та зміну її на арабінозу в подальшому (стадії бутонізації та цвітіння) можна пояснити фізіологічними процесами, які відбуваються у цей час. Так, на початкових етапах розвитку переважно відбуваються процеси поділу клітин і їх диференціювання, що виражається у повільному рості, тому цей період називають періодом «повільного росту» [7]. При переході до стадії бутонізації процеси проліферації та диференціації майже завершуються і починається процес росту за рахунок розтягування клітин. Крім того, у цей період починає формуватися луб і накопичуватися слиз, до складу яких переважно входить арабіноза. Різку зміну вуглеводної специфічності при переході до стадії

бутонізації порівняно з попередньою стадією можна пояснити тим, що у цей період, окрім ростових процесів, починається формування генеративних органів і остаточне формування провідної системи. Саме для формування провідної системи, на нашу думку, лектини у цей період набувають здатності розпізнавати різноманітні моносахариди (фруктозу, глюкозу, арабінозу та галактозу).

Наявність тієї чи іншої вуглеводневої специфічності у лектиноподібних білках різних органів можна пояснити переважанням у них тих чи інших фізіологічних процесів. Так, основною функцією листка є фотосинтез, основний продукт якого – глюкоза. Лектини цього органа незалежно від стадії розвитку здатні розпізнавати її димер – мальтозу. Лектини коренів завжди розпізнають глюкозамін. Це можна пояснити тим, що однією із основних подій, які відбуваються у цьому органі, є утворення та функціонування комплексів із різноманітними мікроорганізмами (бактеріями та міксоміцетами), до складу оболонки яких входить аміносахарид глюкозамін. Здатність лектинів стебла розпізнавати галактозу можна пояснити тим, що цей моносахарид входить до складу провідної системи (ксилеми та флоєми), а також може бути транспортною формою вуглеводів.

Отже, максимальна лектинова активність спостерігається на початкових етапах розвитку, а вуглеводнева специфічність у цей час обмежується здатністю розпізнавати манозу. Зі стадії бутонізації рослин льону починається період «швидкого росту», коли рівень лектинової активності є мінімальним, а спектр вуглеводної специфічності змінюється – з манози на арабінозу. Крім цього, спостерігається зміна як активності, так і вуглеводневої специфічності залежно від органа виділення. Так, на початкових етапах розвитку за активністю лектинів переважає коріння, а на стадіях бутонізації та цвітіння – листя. Активність лектинів стебла є досить низькою протягом усього онтогенезу. У лектинів листя спостерігається наявність специфічності до мальтози, стебла – до галактози, а коренів – до глюкозаміну.

Відомо, що на різних етапах розвитку рослин різних таксонів змінюється і лектинова активність певних органів [3]. Так, упродовж онтогенезу встановлена зміна активності лектинів у квасолі (*Phaseolus* L.) [5], картоплі (*Solanum* L.) [3], яблуні (*Malus* Mill.) [13], м'яті (*Mentha* L.) [11], пшениці (*Triticum* L.) [8] та рослинах багатьох інших родів. Лектинову активність виявляють екстракти стебла, листя, коренів, бульб, цибулин, кореневищ, а також генеративних органів [3]. Визначені такі загальні закономірності зміни активності лектинів у річному циклі розвитку рослин: у насіння активність збільшується при дозріванні; стебла не мають постійного рівня лектинової активності – він збільшується навесні (при пробудженні) та досягає максимуму при дозріванні насіння; у листках активність лектинів збільшується з початком їх повноцінного функціонування та знижується наприкінці вегетації [3]. Нами отримані аналогічні дані стосовно лектинової активності білків різних органів льону олійного.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексидзе Г. Я., Королёв Н. П., Семёнов И. Л., Выхребенцева Э. И. Выделение лектинов и их возможных рецепторов из корнеплода сахарной свеклы // Физиология растений. 1983. Т. 30. № 6. С. 1069–1076.
2. Алексидзе Г. Я., Литвинов А. И., Выхребенцева Э. И. Модель организации на мембране тилакоидов комплекса ферментов цикла Кальвина с участием лектина фотосистемы I // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 1. С. 155–159.
3. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела. Львів: Вид-во ПП «Кварт», 2005. 554 с.

4. *Бабюша А. В.* Действие α -интерферона человека и вирусной инфекции на активность фитогемагглютининов и другие показатели в листьях растений табака и картофеля // Физиология растений. 1995. Т. 42. № 6. С. 891–898.
5. *Безрукова М. В., Лубянова А. Р., Фатхутдинова Р. А.* Участие лектинов пшеницы и фасоли в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней разных растений // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 1. С. 144–151.
6. *Даскалюк Ю. А., Артеміє В. Г., Кириченко О. В.* Лектинова активність білків пасоки *Vitis vinifera* L. // Укр. ботан. журн. 2002. Т. 59. № 4. С. 460–463.
7. *Дьяков А. Б.* Физиология и экология льна. Краснодар: ВНИИМК «МС–Центр», 2006. 214 с.
8. *Комарова Э. М., Выскребенцева Э. И., Трунова Т. И.* Активность лектиноподобных белков клеточных стенок и внешних мембран органелл и их связь с эндогенными лигандами в проростках озимой пшеницы при холодовой адаптации // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 4. С. 511–516.
9. *Луцик М. Д., Панасюк В. М., Луцик А. Д.* Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 156 с.
10. *Лях В. А., Сорока А. И.* Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологическте пути работы с ними: монография. Запорожье: ЗНУ, 2008. 182 с.
11. *Марков Е. Ю., Хавкин Э. Е.* Лектины растений: предполагаемые функции // Физиология растений. 1983. Т. 30. № 5. С. 852–867.
12. *Сизов И. А.* Закономерности развития и роста льна под влиянием внешних факторов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1970. Т. 42. № 1. С. 217–256.
13. *Сытников Д. М., Коць С. Я.* Участие лектинов в физиологических процессах растений // Физиология и биохимия культ. растений. 2009. Т. 41. № 4. С. 279–296.
14. *Шакирова Ф. М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
15. *Dawson R., Elliott D., Elliott U., Jones K.* Data for Biochemical Research. 2nd edn. Oxford: Clarendon Press; 1986. 464 p.

Стаття: надійшла до редакції 27.06.12

доопрацьована 18.09.12

прийнята до друку 25.09.12

THE CHANGE OF LECTINLIKE PROTEINS OF OIL FLAX IN ONTOGENESIS**G. Levchuck, H. Voitovich, V. Lyakh**

*Zaporizhzhya National University
66, Zhukovskiy St., Zaporizhzhya 69063, Ukraine
e-mail: genetika@znu.edu.ua*

The dynamics of quantitative and qualitative characteristics of lectinlike proteins of vegetative organs in **different genotypes of oil flax during the growing season was studied**. It was established that the both indicators depend on the stage of development and organ of origin, but their relationship with the first factor is much stronger. There is also the dependence of lectin activity level on organ association: at the initial stages the most active organs are the roots and starting with budding stage – the leaves.

Keywords: Linum humile L., lectins, organ identity, lectin activity and carbohydrate specificity.

ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ЛЕКТИНОПОДОБНЫХ БЕЛКОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО В ОНТОГЕНЕЗЕ**А. Левчук, Е. Войтович, В. Лях**

*Запорожский национальный университет
ул. Жуковского, 66, Запорожье 69063, Украина
e-mail: genetika@znu.edu.ua*

Исследована динамика количественных и качественных характеристик лектиноподобных белков вегетативных органов льна масличного разных генотипов на протяжении вегетации. Установлено, что оба показателя зависят как от стадии развития, так и от органной принадлежности, однако связь с первым фактором значительно сильнее. Наблюдается также зависимость уровня лектиновой активности от органной принадлежности: на начальных этапах активными являются корни, а начиная со стадии бутонизации – листья.

Ключевые слова: Linum humile L., лектины, органная принадлежность, лектиновая активность, углеводная специфичность.