

Л.П. Панченко¹, Е.С. Коробкова¹, Г.В. Диденко², Е.В. Ястребова¹,
Л.П. Малиновская¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ,
ул. Заболотного 154, Киев ГСП ДО 3680, Украина

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАНУ,
ул. Васильковская, 45, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR. *GRANULUM* НА ЛЕКТИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ КАЛЛУСОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Исследована динамика лектиновой активности каллусов сахарной свеклы, инокулированных молликутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118. Активность кислоторастворимых лектинов клеточных культур сахарной свеклы увеличивалась в 4,5 раза в первые часы после инфицирования ахолеплазмой. На ранних этапах воздействия молликута выявлены также качественные изменения в спектрах белков кислоторастворимых лектинов сахарной свеклы.

Ключевые слова: *Acholeplasma laidlawii*, молликуты, лектины, каллусы сахарной свеклы, стресс.

Растения, находясь в постоянном окружении многочисленных патогенных организмов, претерпевают инфекции и, как правило, выживают в этих неблагоприятных условиях. Колонизация растений патогенами сопровождается изменением ряда физиолого-биохимических показателей, связанных с активизацией сигнальных систем, фосфорилированием белков растений, синтезом защитных полипептидов [6, 14]. При инфицировании растений патогенными микроорганизмами включение механизма устойчивости растительной клетки индуцируется распознаванием фитопатогена, что обусловлено тесным межклеточным контактом, образованием рецептор-лигандного взаимодействия на уровне цитоплазматической мембраны клетки хозяина [14].

В последние годы в литературе активно обсуждается возможность участия лектинов в качестве рецепторов в межклеточных взаимоотношениях растения-хозяина и патогена [3]. Лектины представляют собой белки неиммунной природы, связывающие сахара, агглютинирующие клетки и преципитирующие гликоконъюгаты [2]. Установлено, что фитолектины служат для защиты от разнообразных патогенов, в том числе бактерий и грибов [13]. Вместе с тем, наряду с участием в защитных реакциях к фитопатогенам, лектины вовлекаются в формирование ответных реакций на абиотические стрессовые факторы среды. Имеются данные об увеличении в растениях уровня лектинов при засухе, засолении среды, осмотическом и тепловом шоке [9, 10, 12].

Микоплазмы растений достаточно широко распространены, однако сведения о вовлечении лектинов в процессы формирования защитных реакций при инфицировании микоплазмами практически отсутствуют [7].

Целью данной работы было выявление изменений лектиновой активности каллусов сахарной свеклы, инфицированных ахолеплазмой.

Материалы и методы. Объектом исследования служили клеточные культуры сахарной свеклы СК60/2, любезно предоставленные канд. биол. наук, старшим научным сотрудником Института сахарной свеклы УААН В.И. Редько. Каллусы выращивали на агаризованной среде Гамборга. Инокуляцию каллусов клетками *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118, полученной из национальной коллекции микроорганизмов Украины Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, осуществляли на 21 сутки после пассажа. Молликут культивировали на питательной среде СМ ИМВ-72 [4].

Для получения растворимых лектинов навеску каллусов (0,5 г) растирали в 5 мл 0,05 М HCl, оставляли на 1 ч при 4°C, периодически перемешивая, а затем центрифугировали 20 мин при 10000g. Осадок отмывали половинным от исходного объемом кислоты, супернатанты объединяли [7]. После нейтрализации 1М Na-фосфатным буфером (рН 7,4) супернатант центрифугировали при 8000 g 10 мин и использовали для дальнейшего анализа.

Активность лектинов устанавливали по интенсивности реакции агглютинации трипси-низированных эритроцитов кролика в серии последовательных разведений через 1 ч после начала инкубации в стандартных планшетах для иммунологических исследований. Титр агглютинации выражали как максимальное разведение лектина, при котором еще отмечается агглютинация эритроцитов [2]. Активность лектинов выражали как отношение титра гемагглютинации к концентрации белка. Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли по методу Bradford [11].

Для характеристики лектинов определяли их углеводную специфичность по данным торможения реакции агглютинации углеводами [2]. Использовали 14 углеводов: D-алозу, N-ацетил-D-глюкозамин, D-арабинозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-глюкозамин.HCl, L-ксилозу, мальтозу (Glc1-4Glc), D-маннозу, мелибиозу (Gal1-6Glc), D-рибозу, L-рибозу, талозу, сахарозу.

Фракционирование белков при электрофорезе в 10 %-ном ПААГ осуществляли на приборе для электрофореза в вертикальных пластинах геля в присутствии 2 %-ного додецилсульфата-Na по методу Laemmli [15]. Относительные молекулярные массы рассчитывали по стандартным маркерам ("Pharmacia", Швеция): альдолаза – 158 кДа, фосфорилаза В – 97 кДа, бычий сывороточный альбумин – 67 кДа, овалбумин – 43 кДа и маркерам для электрофореза ("Fermentans" SM 0661, Литва).

Опыты проводили в трех повторностях биологических и аналитических. Графические результаты получены с использованием компьютерных программ – прикладной пакет Microsoft Excel 2000.

Результаты и их обсуждение. Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о том, что лектиновая активность каллусов сахарной свеклы, инфицированных суспензией клеток *A. laidlawii var. granulum* шт. 118 (плотность 2×10^6 /мл), через одни сутки после заражения увеличилась лишь на 50 % по сравнению с контролем, затем через двое суток наблюдали спад лектиновой активности, а после трех суток с момента заражения уровень лектиновой активности инфицированных каллусов практически не отличался от контрольных каллусов сахарной свеклы, не зараженных микоплазмой.

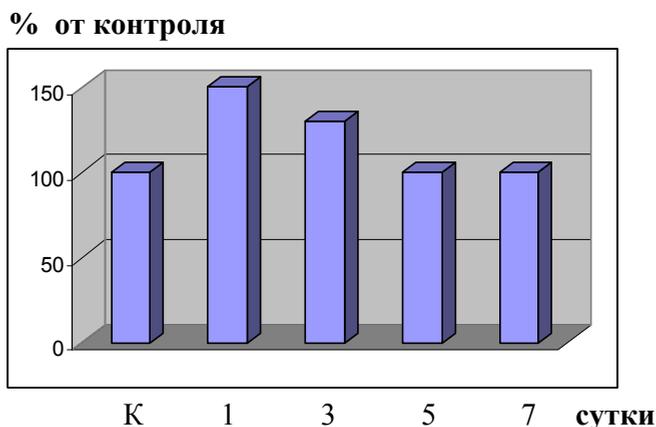


Рис. 1. Изменение лектиновой активности каллусов сахарной свеклы в течение 7 суток после инокуляции *A. laidlawii var. granulum* шт. 118; К – контроль.

Как следует из данных литературы, лектины растений отвечают за процесс узнавания чужеродного агента, его связывание, предотвращение или замедление процесса инфицирования [6]. Исходя из этого, мы предположили, что лектиновая активность в культуре клеток сахарной свеклы при воздействии фитопатогенного молликута – *A. laidlawii var. granulum* шт. 118 должна в значительной степени проявиться на ранних стадиях инфицирования. В связи с этим нами проведено изучение динамики лектиновой активности в каллусах сахарной свеклы в течение первых 12 ч от момента инокулирования их *A. laidlawii var. granulum* шт. 118 (рис. 2).

% от контроля

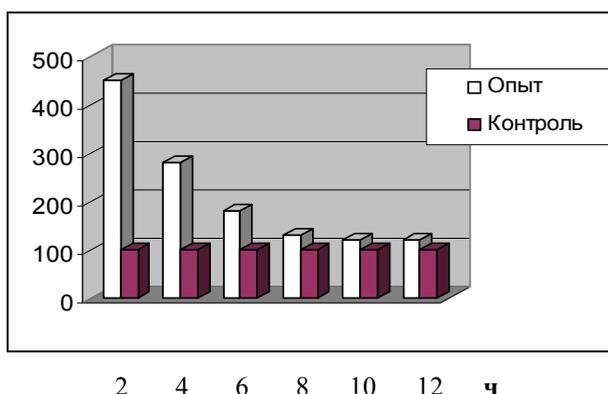


Рис. 2. Изменение лектиновой активности каллусов сахарной свеклы в течение 12 ч после инфицирования их *A. laidlawii var. granulum* шт. 118.

Как видно из представленных данных, активность растворимых лектинов в исследованных каллусах сахарной свеклы через 2 ч после инфицирования ахолеплазмой увеличилась в 4,5 раза по сравнению с контролем, через 4 ч уровень лектиновой активности снижался в 2 раза. В последующие часы активность лектинов зараженных каллусов незначительно отличалась от активности в контрольных образцах.

Сравнительное изучение углеводной специфичности лектинов здоровых и инфицированных ахолеплазмой каллусов сахарной свеклы выявило их различную активность по отношению к использованным углеводам. Так, лектины контрольных образцов исследованных каллусов были специфичны к мелибиозе (Gal1-6Glc) и мальтозе (Glc1-4Glc). У лектинов из каллусов, инфицированных *A. laidlawii var. granulum* шт. 118, мы обнаружили специфичность по отношению также к D-алозе, N-ацетил-D-глюкозамину, D-глюкозамину HCl, L-ксилозе, L-рибозе (табл. 1).

Таблица 1

Углеводная специфичность лектинов каллусов сахарной свеклы

Углеводы	Минимальная концентрация углеводов (мМ), ингибирующих реакцию геагглютинации лектинов каллусов сахарной свеклы:	
	контрольных	инфицированных ахолеплазмой
мелибиоза (Gal1-6Glc)	75	37,5
мальтоза (Glc1-4Glc)	37,5	18,75
D-алоза	-	9,38
N-ацетил-D-глюкозамин	-	18,75
D-глюкозамин HCl	-	9,38
L-ксилоза	-	37,5
L-рибоза	-	9,38

Примечание: “-” – отсутствие ингибирования.

Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные об увеличении уровня лектинов при действии на растения самых разнообразных стрессовых факторов – патогенов микробной, грибной и вирусной природы, неблагоприятных условий внешней среды, дают основание предполагать, что лектины вовлекаются в один из универсальных неспецифических механизмов защиты растений [8, 13, 16]. Полученные нами данные об изменении лектиновой активности и углеводной специфичности клеточной культуры сахарной свеклы при инфицировании ахолеплазмой подтверждают данные литературы о неспецифическом ответе растительных клеток на действие патогена.

Известно, что при инфицировании патогенами в клетках растений активируются системы защиты, приводящие к экспрессии генов [5]. При этом происходит замедление синтеза одних белков и усиленное образование других, что проявляется в изменении электрофоретического спектра синтезируемых белков.

В наших экспериментах инфицирование каллусов сахарной свеклы *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 оказало воздействие на белковый спектр кислоторастворимых лектинов (табл. 2).

Таблица 2

Молекулярные массы растворимых белков каллусов сахарной свеклы, инокулированных *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118

Контроль	Время, ч			
	2	4	6	12
молекулярная масса, кДа				
120	120	120	120	120
100	100	100	100	100
85	85	85	85	85
70	80	70	67	70
60	67	50	60	60
	30			

Примечание: контроль – неинфицированные каллусы; 2,4,6,12 ч – время после инокуляции каллусов *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118.

При этом следует отметить, что наиболее существенные изменения в спектрах белков под влиянием микоплазменной инфекции наблюдали на ранних этапах инфицирования каллусов. Так, если в контрольных образцах выявлены полипептиды с молекулярной массой 120, 100, 85, 70 и 60 кДа, то через 2 ч после инокуляции патогеном в клеточных культурах сахарной свеклы появляются полипептиды с молекулярной массой 80, 67, 30 кДа. В кислоторастворимых фракциях белков каллусов, полученных через 4 ч после заражения ахлеплазмой, появлялся полипептид с молекулярной массой 50 кДа. Нами не выявлены, в сравнении с контрольными образцами, качественные изменения в спектрах белков растворимых лектинов, которые получены через 12 ч после инфицирования каллусов *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118.

Таким образом, данные исследования лектиновой активности каллусов сахарной свеклы свидетельствуют о том, что под влиянием фитопатогенного молликута *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 в клеточных культурах сахарной свеклы в ответ на инфицирование патогеном включаются защитные механизмы, что подтверждается изменением белкового спектра растворимых лектинов и значительным увеличением их активности в первые часы инокуляции молликутом. Полученные нами данные коррелируют с имеющимися в литературе сведениями об участии лектинов в регуляции защитных реакций растительных клеток при инфицировании их патогеном.

**Л.П. Панченко ¹, К.С. Коробкова ¹, Г.В. Діденко ²,
О.В. Ястребова ¹, Л.П. Малиновська ¹**

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, Київ

² Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАНУ, Київ

ВПЛИВ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR. *GRANULUM* НА ЛЕКТИНОВУ АКТИВНІСТЬ КАЛЮСІВ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ

Резюме

Досліджено динаміку лектинової активності калюсів цукрового буряку, інокульованих молікутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118. Активність кислоторозчинних лектинів клітинних культур цукрового буряку збільшувалась в 4,5 рази в перші години після інфікування ахлеплазмою. На ранніх етапах інфікування молікутом виявлено також якісні зміни в спектрах білків кислоторозчинних лектинів калюсів цукрового буряку.

Ключові слова: *Acholeplasma laidlawii*, молікути, лектини, калюси цукрового буряку, стрес.

**L.P. Panchenko¹, E.S. Korobkova¹, G.V. Didenko²,
O.V. Iastrebova¹, L.P. Malinovskaya¹**

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² Kavetsky Institute of Experimental Patology, Oncology and Radiobiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

EFFECT OF *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR. *GRANULUM* ON LECTIN ACTIVITY OF SUGAR BEET CALLUSES

S u m m a r y

The dynamics of lectin activity of sugar beet calluses infected by mollicute *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* str. 118 was studied. Activity of acid-soluble lectins of sugar beet cell cultures increased 4.5 times during some first hours after infecting by acholeplasma. At early stages of infecting by mollicute qualitative changes were also revealed in the protein spectra of acid-soluble lectins of sugar beet calluses.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Acholeplasma laidlawii*, mollicutes, lectine, calluses of sugar beet, stress.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: L.P. Panchenko, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Кулаева О.Н., Микулович Т.П., Хохлова В.А. Стрессовые белки растений //Современные проблемы биохимии. М.: Наука.-1991.-С.174-190.
2. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцки А.Д. Лектины. – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
3. Любимова Н.В., Щербухин В.Д. Процессы межклеточного узнавания и индицирование устойчивости клубней картофеля к болезням // Прикл.биохимия и микробиол. – 1991. – **27**, №1. – С.3–16.
4. Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. – 1984. – **46**, №2. – С.71–75.
5. Тарчевский И.А.Патоген-индуцированные белки растений (Обзор)// Прикл.биохимия и микробиол. – 2001. – **37**, № 5. – С. 517–532.
6. Тарчевский И.А., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., Чернов В.М. Микоплазма- индуцированные и жасмонат-индуцированные белки растений гороха // Докл.РАН. – 1996. – **350**, №4. – С.544–545.
7. Трифонова Т.В., Максютова Н.Н., Тимофеева О.А., Чернов В.М. Изменение лектиновой активности проростков озимой пшеницы при инфицировании микоплазмами // Прикл.биохимия и микробиол. – 2004. – **40**, № 6. – С. 675–679.
8. Хайруллин Р.М., Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Максимов И.В., Ямалеев А.М. Изменение содержания лектина, абсцизовой и индолилуксусной кислот в растениях пшеницы, инфицированных *S. nodorum* // Физиология и биохимия культ. раст. – 1993. – **25**, В.2. – С.138–143.
9. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Хайруллин Р.М. Увеличение уровня лектина в проростках пшеницы под влиянием солевого стресса // Изв. РАН. – 1993. – №1. – С.143–145.
10. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Шахметов И.Ф. Влияние теплового стресса на динамику накопления АБК и лектина в клетках каллуса пшеницы // Физиол. раст. – 1995. – **42**, №5. – С.700–702.
11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **71**, N 2. – P.248–254.
12. Cammue B.P.A., Broekaert W.F., Kellens J.T.C., Raikhel N.V., Peumans W.J. Stress-induces accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings // Plant Physiol. – 1989. – **91**, N4. – P.1432–1435.
13. Cammue B.P.A., Broekaert W.F., Peumans W.J. Wheat germ agglutinin in wheat seedling roots induction by elicitors and fungi // Plant Cell Rept. – 1990. – **9**, N3. – P.264–267.
14. Deen R.A., Kuć J. Induced systemic protection in plant // Trends in Biotechnology. – 1985. – **3**, N5. – P.125–129.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, N 5259. – P.620–685.
16. Коваленко О.Г., Кириченко А.М., Телегеева Т.А. Вплив ВТМ- інфекції на вміст білків і вуглеводів у надчутливих рослинах тютюну та їхню антивірусну та гемаглютинувальну активність // Український біохімічний журнал.-2003.-75, № 2.- С.103-108.

Отримано 20.03.2010