

Вплив екзогенного лектину пшениці на вміст флавоноїдів та зміну лектинової активності у проростках пшениці за умов ультрафіолетового опромінення

О. В. Кириченко, Г. Ю. Перковська¹

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
Вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна

¹Інститут клітинної біології і генетичної інженерії Національної академії наук України
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 04143, Україна

E. mail: azot@ifrg.freenet.kiev.ua

Визначено, що УФ опромінення п'ятидобових проростків пшениці призводить до збільшення в них лектинової активності. Попередня обробка насіння пшениці лектином спричинила ще більше зростання лектинової активності як у паростках, так і в коренях проростків. Поряд з цим відмічено підвищення вмісту флавоноїдів у проростках пшениці. Виявлено дозозалежний ефект протекторної дії лектину пшениці на ранньому етапі онтогенезу рослин в умовах УФ опромінення.

Ключові слова: лектин, лектинова активність, флавоноїди, УФ опромінення, проростки пшениці.

Вступ. Ультрафіолетове випромінювання складає приблизно 8—9 % сонячної радіації [1] і поділяється на три діапазони — УФ-С (200—280 нм), УФ-В (280—320 нм), УФ-А (320—400 нм), серед яких значні uszkodження рослин індукує саме УФ-В опромінення. Захист рослин від пошкоджень, індукованих УФ радіацією, є складним процесом, до якого причетні ферментативні і неферментативні механізми.

Одним із важливих механізмів адаптації рослин до стресових факторів, а саме — УФ опромінення є активація антиоксидантних систем. До неферментативних захисних механізмів належать перехоплювачі вільних радикалів — флавоноїди,

що функціонують як фільтри УФ-В опромінення [2—4]. Найбільший вплив на синтез флавоноїдів має УФ випромінювання в області 280—320 нм. Присутність цих сполук у тканинах епідермісу та в мезофілі листків знижує вірогідність виникнення УФ-індукованих пошкоджень. У клітині флавоноїди зосереджені, головним чином, у вакуолях, однак можуть бути ковалентно зв'язаними з мембранами. Показано, що після дії УФ-В у рослин кукурудзи в камері протягом 10 діб збільшувалися кількість флавоноїдів і синтез нових білків [4], причому сумарний вміст білка по відношенню до сухої маси рослин знижувався, тоді як вміст розчинних білків зростав.

Лектини — це вуглеводзв'язувальні білки, або глікопротеїди [5, 6], які характеризуються полі-

функціональністю у рослинному організмі [7, 8]. Вони присутні у вегетативних і генеративних органах рослин у розчинній та мембранозв'язаній формах [5, 6]. Відомо, що рослинні лектини беруть участь в адаптаційних процесах рослин у стресових умовах і є однією з ланок біохімічних механізмів захисту рослин за дії абіотичних факторів зовнішнього середовища [8—11]. Виходячи з цього, ми припустили можливість участі лектинів у захисті рослин в умовах УФ опромінення.

Метою цієї роботи було дослідження вмісту флавоноїдів та зміни лектинової активності і її локалізації в різних органах проростків пшениці за дії лектину пшениці на насіння та УФ опромінення.

Матеріали і методи. Досліди проводили з насінням ярої пшениці сорту Рання 93 та лектином пшениці (аглютиніном зародків пшениці, «Лектинотест», Україна). Для обробки насіння пшениці використовували лектин у концентраціях 1, 5, 10 і 20 мкг/мл. Насіння обробляли розчинами лектину протягом 1 год, розкладали на вологі фільтри у чашки Петрі (25 насінин на чашку у чотирьох повтореннях) і пророщували протягом тижня при температурі 22 °С. За контроль було насіння, замочене протягом 1 год у воді. На 5-ту добу росту проростки піддавали дії УФ опромінення, джерелом якого були дві лампи ДБ-30.

Дозиметрію виконано за допомогою приладу ДАУ-81 з відповідним детектором. Потужність дози випромінювання становила 3,024 кДж/м².

Лектини виділяли із семидобових проростків пшениці за методикою [12], екстрагуючи білки 76 %-м етанолом. Після центрифугування екстракту у режимі 8000 об/хв протягом 30 хв збирали осад, який розчиняли в 1 мл фізіологічного розчину.

Лектинову активність (ЛА) визначали в реакції гемаглютинації (РГА) [5] з еритроцитами людини I групи крові. Титр лектину відповідає його розведенню в останній лунці планшету, де ще спостерігається аглютинація. Одиниця аглютинації (ОА) — величина, зворотна титру аглютинації. ОА в 50 мкл розчину (ОА/50 мкл) виражали як фактичну лектинову активність (ФЛА). Питому лектинову активність (ПЛА) виражали в ОА/мг білка. Кількісний вміст білка в препаратах, виділених із проростків пшениці, визначали за методикою [13]. Вплив екзогенного лектину пшениці на

лектинову активність у проростках оцінювали за зміною показника ПЛА у відсотках при порівнянні з контролем (обробка насіння водою). Зміну ЛА в проростках пшениці за дії УФ опромінення виявляли, аналізуючи цей показник у контрольних (УФ-) і опромінених (УФ+) рослин.

Вміст флавоноїдів у проростках пшениці визначали за методом [14], екстрагуючи їх метанолом, підкисленим соляною кислотою. Кількість флавоноїдів, які містяться у рослинних зразках, вимірювали на СФ-26 в УФ області спектра при довжині хвиль 280—350 нм. При цьому враховували, що різні класи фенольних сполук відрізняються один від одного за спектром поглинання (*D*) і дають максимуми поглинання, які належать до I (320—380 нм) і II (240—280 нм) смуг.

Результати і обговорення. Визначено, що УФ опромінення п'ятидобових проростків ярої пшениці Рання 93 призвело до збільшення показника ЛА в паростках і коренях семидобових проростків (табл. 1). Проростки контрольного варіанту (передпосівна обробка насіння водою) характеризувалися максимальною ЛА в коренях, яка у 4 рази перевищувала ФЛА в паростках. За дії УФ променів рівень ПЛА в паростках зріс у 1,2 разу, а в коренях — удвічі порівняно з неопроміненими рослинами.

Отже, за дії УФ опромінення у рослин, насіння яких не обробляли екзогенним лектином пшениці, відмічено зростання ЛА як у паростках, так і в коренях проростків, але в коренях цей показник змінювався суттєвіше.

За нормальних умов росту проростків контрольного варіанту ЛА коренів удвічі перевищувала таку паростків (табл. 2). Передпосівна обробка насіння пшениці рослинним лектином у різних концентраціях (1—20 мкг/мл) призвела до посилення ЛА у проростках УФ- (табл. 2). УФ опромінення викликало зростання ЛА у проростках пшениці, насіння якої обробляли лектином (табл. 1), порівняно з рослинами УФ- (табл. 2).

Так, у паростках проростків пшениці у варіантах з обробкою насіння екзогенним лектином пшениці значення ФЛА зросло у 4—8 разів, а показник ПЛА — у 1,2—3,1 разу в залежності від концентрації лектину. У коренях дослідних рослин значення ФЛА збільшилося у 2 рази або лишалося без змін (у варіанті з 20 мкг лектину), тоді як показник ПЛА несуттєво перевищував (у 1,2—1,4 разу) ЛА в коренях рослин УФ- (табл. 1).

Таблиця 1

Лектинова активність у паростках і коренях проростків ярої пшениці Рання 93 за дії екзогенного лектину пшениці та УФ опромінення

Лектин (мкг/мл) + УФ	Фактична лектинова активність		Питома лектинова активність	
	ОА/50 мкл	ОА/мг білка	%	
<i>Паросток</i>				
Вода	4	30,18±0,04	100	
1	8	35,55±0,06	118	
5	16	96,41±0,40	320	
10	32	232,31±8,31	770	
20	32	156,56±0,09	519	
<i>Корінь</i>				
Вода	16	117,97±0,05	100	
1	16	151,61±0,15	129	
5	16	136,77±0,09	116	
10	32	367,72±2,87	312	
20	32	433,70±0,44	368	

Таблиця 2

Лектинова активність у паростках і коренях проростків ярої пшениці Рання 93 за дії екзогенного лектину на насіння

Лектин, мкг/мл	Фактична лектинова активність		Питома лектинова активність	
	ОА/50 мкл	ОА/мг білка	%	
<i>Паросток</i>				
Вода	2	25,23±0,06	100	
1	2	36,64±1,05	145	
5	4	71,73±0,18	284	
10	4	73,43±5,24	291	
20	8	82,50±0,06	327	
<i>Корінь</i>				
Вода	4	59,82±0,64	100	
1	8	113,37±0,17	190	
5	8	189,36±1,13	317	
10	16	301,99±1,26	505	
20	32	323,84±2,93	541	

Таким чином, у надземній частині рослини відбуваються суттєвіші зміни метаболізму, а саме — збільшення ЛА, яке може бути однією із складових захисних реакцій рослини в умовах УФ опромінення.

Порівняльна оцінка зміни ЛА у варіантах з лектиновою обробкою насіння і без неї за дії УФ опромінення також свідчить про зростання лектинової активності (табл. 1). Значення ФЛА в паростках дослідних рослин порівняно з контрольними (обробка водою) за дії УФ променів зросло у 2—8 разів залежно від концентрації лектину. У коренях проростків ФЛА підвищилася вдвічі у варіантах з лектином у концентраціях 10 і 20 мкг/мл та лишалася на рівні контролю у варіантах з концентраціями лектину 1 і 5 мкг/мл (табл. 1). Перерахунок ФЛА на ПЛА (активність 1 мг білка) також свідчить про зростання ЛА як у паростках, так і в коренях проростків дослідних варіантів в умовах УФ опромінення (табл. 1). Причому істотніше збільшення показників ПЛА спостерігалось у паростках, а не в коренях проростків. Обробка насіння лектином у мінімальній (1 мкг/мл) концентрації спричинила збільшення ПЛА в паростках і коренях

за дії УФ променів на 18 і 29 % відповідно порівняно з контролем (обробка насіння водою). Вища концентрація лектину (5 мкг/мл) призвела до зростання ПЛА в паростках у 3,2 разу, тоді як ПЛА в коренях лишалася майже на рівні контролю (16 %). У варіантах з лектином у концентраціях 10 і 20 мкг/мл ЛА в паростках збільшилася у 7,7 і 5,2 разу відповідно, тоді як ЛА коренів — у 3,1 і 3,7 разу.

Отже, виявлений нами факт активнішого зростання рівня ЛА в паростках, а не в коренях проростків, насіння яких обробляли екзогенним лектином пшениці, відрізняє реакцію даних рослин на дію УФ опромінення від відповіді рослин контрольного варіанту (обробка насіння водою), для яких встановлено більш суттєву зміну показника ЛА в коренях, а не в паростках.

Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчить про те, що надземна частина рослини є більш чутливою до дії УФ променів, ніж коріння, і однією з біохімічних відповідей рослини на даний чинник довкілля є посилення ЛА в паростках. Оскільки передпосівна обробка насіння пшениці екзогенним специфічним лектином призвела до

Таблиця 3

Вміст флавоноїдів у проростках ярої пшениці Рання 93 за дії екзогенного лектину пшениці та УФ опромінення

Лектин (мкг/мл) + УФ	Довжина хвилі, нм				
	280	300	310	330	350
	Флаванони, халкони, антоціанідини	Флаванони	Ізофлаволи, флаванони, флаволи	Флавоноли, флаволи	
Вода	0,45±0,01	0,46±0,00	0,46±0,01	0,46±0,01	0,40±0,00
1	0,90±0,01	0,79±0,01	0,71±0,01	0,71±0,01	0,58±0,00
5	0,71±0,01	0,69±0,01	0,68±0,02	0,65±0,01	0,53±0,01
10	1,31±0,01	0,98±0,01	0,92±0,01	0,91±0,01	0,73±0,01
20	1,26±0,00	1,25±0,00	0,84±0,01	0,99±0,01	0,70±0,00

значного зростання показників лектинової активності в паростках і коренях рослин УФ+ на ранньому етапі онтогенезу, можна припустити, що лектин пшениці здатний виконувати протекторну роль в умовах УФ опромінення. Одержані результати дають підставу зробити попередній висновок про те, що передпосівна обробка насіння рослинним лектином в умовах УФ опромінення може спричинювати підвищення адаптивного потенціалу рослин на ранньому етапі розвитку.

Із літератури відомо про важливу роль флавоноїдів як індукцйбельних протекторів рослин, які ростуть в умовах підвищеного УФ опромінення [2—4]. Вважається, що флавоноїди та деякі інші фенольні сполуки, локалізовані у клітинних стінках епідермальних клітин, перешкоджають УФ променям досягти мезофільних клітин та зашкодити фотосинтезу [2]. У бобових і більшості дводольних рослин флавоноїди розташовані в епідермісі, а в однодольних — як в епідермісі, так і в мезофілі. Одним із механізмів захисту рослин від підвищених рівнів УФ-В опромінення є нагромадження в листках УФ поглинаючих фільтрів — флавоноїдів. Виходячи з цього, ми провели визначення вмісту флавоноїдів у семидобових проростках пшениці Рання 93, яких на 5-ту добу росту піддавали дії УФ променів.

Отримані результати показали (табл. 3), що проростки ярої пшениці Рання 93 містять різні речовини фенольної природи, а саме — флаванони (275—290 і 310—330 нм), ізофлаволи (310—330 нм), флаволи (310—350 нм), флавоноли (350—390 і 300 нм), халкони (240—280 нм) і

антоціанідини (270—280 нм). Усі ці сполуки виявлено як у проростках контрольного (обробка насіння водою), так і в проростках дослідних варіантів (обробка насіння лектином пшениці). Встановлено, що у контрольних проростках пшениці після УФ опромінення міститься майже однакова кількість флавоноїдів різних класів (0,40—0,46 мкг/мл). Передпосівна обробка насіння пшениці лектином у різних концентраціях призвела до збільшення вмісту флавоноїдних сполук у проростках пшениці за умов УФ опромінення.

Так, при низьких концентраціях лектину (1 і 5 мкг/мл) підвищувався рівень накопичення різних флавоноїдів у проростках в 1,3—1,5 разу порівняно з контролем (обробка насіння водою). При цьому спостерігалось активніше накопичення фенольних сполук класів флаванонів, халконів і антоціанідинів (табл. 3). Для даних варіантів їхня кількість у проростках пшениці зростає в 1,5—2 рази. Аналогічну закономірність за вмістом різних класів флавоноїдів у проростках пшениці відмічено і у варіантах з лектином у концентраціях 10 і 20 мкг/мл, де вміст антоціанідинів, халконів і флаванонів збільшувався у 2,7—2,8 разу, тоді як для інших груп флавоноїдних сполук — у 1,7—2,1 разу (табл. 3).

Дослідження впливу УФ опромінення на накопичення та внутрішньотканинну локалізацію фенольних сполук у двох штамів калюсних культур чайного дерева, які відрізнялися за морфологічними характеристиками та біосинтетичної здатності, показало зростання рівня накопичення розчинних фенольних сполук і їхнє зосередження у

клітинних стінках і міжклітинниках. Більшу стійкість до дії УФ опромінення виявив штам з високою здатністю до утворення фенольних сполук [15]. Про суттєве зростання вмісту антоціанів у листках рослин енотери за дії УФ променів у дозах 1,2—4,8 кДж/м² відомо з роботи [16].

Необхідно зазначити, що виявлена нами протекторна дія рослинного лектину відносно проростків пшениці в умовах УФ опромінення залежала від концентрації екзогенного лектину, який використовували для обробки насіння (табл. 1, 3). Низькі концентрації лектину (1 і 5 мкг/мл) спричиняли менш виражену дію в активації захисних систем рослини, а саме — флавоноїдної системи, ніж його високі концентрації (10 і 20 мкг/мл). Значна різниця у впливі досліджуваних концентрацій лектину (1—20 мкг/мл) на вміст флавоноїдних сполук у проростках пшениці під дією УФ опромінення є очевидною. Максимальний позитивний ефект був спричинений лектином у концентраціях 10 і 20 мкг/мл (табл. 3). Аналогічні закономірності дії різних концентрацій лектину пшениці встановлено і для показника зміни активності ендогенного лектину в проростках за умов УФ опромінення (табл. 1).

Отже, узагальнюючи одержані результати, можна зробити висновок про те, що УФ опромінення впливає на адаптивний потенціал рослин. Результати наших дослідів свідчать переважно про підвищення цього потенціалу стосовно впливу УФ опромінення під дією лектину пшениці на насіння.

Висновки. Таким чином, з отриманих нами результатів вивчення впливу лектину пшениці при екзогенній обробці насіння на вміст флавоноїдів та лектинову активність у проростках пшениці при дії УФ променів випливає, що екзогенний лектин пшениці виявляє протекторну дію стосовно рослин на ранньому етапі онтогенезу при несприятливому впливі УФ радіації. Складовими біохімічного механізму протекторної дії лектину при обробці насіння є індукування молекулярних компонентів системи захисту рослин, а саме — флавоноїдної системи і активація ендогенного лектину в проростках. Передпосівна обробка насіння пшениці специфічним для рослини лектином може бути одним із засобів зростання захисного потенціалу рослин на ранньому етапі онтогенезу в умовах підвищених доз УФ випромінювання.

O. V. Kyrychenko, G. Yu. Perkovskaya

Effect of endogenous wheat lectin on flavonoid content and change in lectin activity of wheat seedlings at UV-radiation

Summary

UV-irradiation of 5-day wheat seedlings was shown to result in the increase in lectin activity. An additional induction of the lectin activity in both stems and roots of seedlings was found after the preliminary treatment of seeds by lectin. The apparent increase in the flavonoid contents in wheat seedlings was marked. The data obtained suggest that the exogenous wheat lectin protects the plants against UV-irradiation at early stage of ontogenesis in dose dependent manner.

Key words: lectin, lectin activity, flavonoid, UV-irradiation, wheat seedlings.

O. B. Кириченко, Г. Ю. Перковская

Влияние экзогенного лектина пшеницы на содержание флавоноидов и изменение лектиновой активности в проростках пшеницы под влиянием ультрафиолетового облучения

Резюме

Установлено, что УФ облучение пятисуточных проростков пшеницы приводит к увеличению в них лектиновой активности. Предварительная обработка семян лектином вызвала еще большее увеличение лектиновой активности как в стеблях, так и корнях проростков. Вместе с тем отмечено возрастание уровня содержания флавоноидов в проростках пшеницы. Выявлен дозозависимый эффект протекторного действия экзогенного лектина пшеницы на раннем этапе онтогенеза под влиянием УФ излучения.

Ключевые слова: лектин, лектиновая активность, флавоноиды, УФ облучение, проростки пшеницы.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Caldwell M. M. Plant response to solar ultraviolet radiation // Encyclopedia of Plant Physiology // Eds O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, H. Ziegler.—Berlin: Springer, 1981.—Vol. 12A.—P. 169—197.
2. Caldwell M. M., Robberecht R., Flint S. D. Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants // *Physiol. Plant.*—1983.—58.—P. 445—450.
3. Logemann E. T., Smith K. A. UV light selectivity coincides supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 1903—1907.
4. Santos J., Alnejda J. M., Salema R. Plants of *Zea mais* L. developed under enhanced UV-B radiation. Some ultrastructural and biochemical aspects // *J. Plant Physiol.*—1993.—141.—P. 450—456.
5. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины.—Львов: Вища школа, 1981.—154 с.
6. Pusztai A. Plant lectins.—New York: Cambridge Univ. press, 1991.—348 p.
7. Марков Е. Ю., Хавкин Э. Е. Лектины растений: предполагаемые функции // *Физиология растений.*—1983.—30, № 5.—С. 852—867.
8. Ямалеева А. А. Лектины растений и их биологическая роль.—Уфа: РИЦ Башкир. ун-та, 2001.—202 с.

9. Комарова Э. И., Выскребенцева Э. И., Трунова Т. И. Изменение лектиновой активности меристемы узла кущения озимой пшеницы при закаливании к морозу // Физиология растений.—1995.—42, № 4.—С. 612—615.
10. Шакирова Ф. М., Безрукова М. В., Хайрулин Р. М. Увеличение уровня лектина в проростках пшеницы под влиянием солевого стресса // Изв. РАН, серия Биология.—1993.—№ 1.—С. 142—145.
11. Шакирова Ф. М., Безрукова М. В., Шахметов И. В. Влияние теплового стресса на динамику накопления АБК и лектина в клетках каллуса пшеницы // Физиология растений.—1995.—42, № 5.—С. 700—702.
12. Вязов О. Е. Лабораторные методы исследований в неинфекционной иммунологии.—М.: Медицина, 1967.—130 с.
13. Whitaker J. R., Einar G. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm // Anal. Biochem.—1980.—109.—P. 156—159.
14. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений.—К.: Наук. думка, 1973.—590 с.
15. Загоскина Н. В., Дубравина Г. А., Алявина А. К., Гончарук Е. А. Влияние ультрафиолетовой радиации (УФ-Б) на образование и локализацию фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения // Физиология растений.—2003.—50, № 2.—С. 302—308.
16. Гуца Н. И., Перковская Г. Ю., Дмитриев А. П., Гродзинский Д. М. Влияние хронического облучения на адаптивный потенциал растений // Радиационная биология. Радиозкология.—2002.—42, № 2.—С. 155—158.

УДК 633:614.875:581.192
Надійшла до редакції 16.03.05