

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

3 (315)

МАМЫР – МАУСЫМ 2016 ж.

МАЙ – ИЮНЬ 2016 г.

MAY – JUNE 2016

1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН

ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА

PUBLISHED SINCE JANUARY 1963

ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ

ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД

PUBLISHED 6 TIMES A YEAR

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

Ж. А. Арзықұлов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к ең е с і:

Абжанов Архат (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

Ж. А. Арзыкулов

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**, доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахисhev**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

Абжанов Архат (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov,
academician of NAS RK

Editorial board:

N.A. Aitkhozhina, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

Abzhanov Arkhat (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.
ISSN 2224-5308

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 46 – 53

**INFLUENCE OF CHITIN-GLUCAN COMPLEX AND
CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE ON THE ACTIVITY
 β -1,3-GLUCANASE AND CHITINASE OF WHEAT PLANTS**

**A. Dalelhankhyzy, N. S. Mamytova, Zh. D. Beskempirova,
B. Tilegen, V. A. Kuzovlev, A. A. Khakimzhanov**

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: a.khakimzhanov@mail.ru

Keywords: wheat seedlings, β -1,3-glucanase, chitinase, isoenzymes, induction, chitin-glucan complex, chitosan oligosaccharide.

Abstract. In the protection of plants against fungal pathogen fundamental importance are specific substances - elicitors. Among them the best known are starchy substances, such as β -glucan, chitin, chitosan and their oligomeric derivatives. The elicitors are important in cell signal transduction, phytoalexins induction, and activation of defense genes, as well as associated with the pathogenesis PR-proteins. As part of the latest especially importance are hydrolytic enzymes - β -1,3-glucanases and chitinases, which can destroy the cell walls of fungi.

This work is devoted to the a weakly-studied aspect - the effect of chitin-glucan complex (CGC) cell wall (CW) of the fungus *Fusarium graminearum* and chitosan oligosaccharide (COS) on the induction and activation of β -1,3-glucanase and chitinase in wheat seedlings. It was established that these amino carbohydrate agents cause in the stem and root of the rise of glucanase and chitinase activity - the initial (2 and 4 hour) and later period – on the 16 hours. However, in the presence of HOS two-phase pattern of the enzymes activation has been more clearly defined. On the isoenzyme level CGC caused in rout de novo synthesis components β -1,3-glucanase with pI 3.3 and 7.8, and among the chitinases - isoforms with pI 3.1 and 3.5. In the presence of COS in both organs induced isozymes β -1,3-glucanase with pI 7.2 and 8.0. Among the stem chitinases are induced acidic isozymes (pI 3.1, 3.5).

The data show a particularity eliciting properties of CGC and COS in the inducing effect on isozymes of β -1,3-glucanase and chitinase wheat seedlings. Results may be used in biochemistry interactions of plants and phytopathogenic fungi.

УДК 581.19:633.1

ВЛИЯНИЕ ХИТИН-ГЛЮКАНОВОГО КОМПЛЕКСА И ХИТОЗАН ОЛИГОСАХАРИДА НА АКТИВАЦИЮ β -1,3-ГЛЮКАНАЗЫ И ХИТИНАЗЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

А. Далелханкызы, Н. С. Мамытова, Ж. Д. Бескемпирова,
Б. Тилеген, В. А. Кузовлев А. А. Хакимжанов

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», г. Алматы

Ключевые слова: проростки пшеницы, β -1,3-глюканаза, хитиназа, изоферменты, индукция, хитин-глюкановый комплекс, хитозан олигосахарид.

Аннотация. В защите растения от грибного патогена принципиальную значимость имеют специфические вещества - элиситоры. Среди них наиболее известны углеводистые вещества, такие как β -глюкан, хитин, хитозан и их олигомерные производные. Элиситоры имеют важное значение в клеточной сигнальной трансдукции, индуцировании фитоалексинов и активации защитных генов, а также связанных с патогенезом PR-белков. В составе последних особую значимость имеют гидролитические ферменты - β -1,3-глюканазы и хитиназы, способные разрушать клеточные стенки грибов.

Данная работа посвящена слабоизученному аспекту - влиянию хитин-глюканового комплекса (ХГК) клеточных стенок (КС) гриба *Fusarium graminearum* и хитозан олигосахарид (ХОС) на индукцию и активацию β -1,3-глюканазы и хитиназы в проростках пшеницы. Установлено, что эти аминокислотные агенты вызывают в стебле и корне подъем глюканазной и хитиназной активности - в начальный (2 и 4 час) и более поздний период - на 16 ч. Однако в присутствии ХОС 2-х фазный характер активизации ферментов был более четко выражен. На изоферментном уровне ХГК вызывал в корне синтез de novo компонентов β -1,3-глюканазы с pI 3.3 и 7.8, а в составе хитиназы - изоформ с pI 3.1 и 3.5. В присутствии ХОС в обоих органах индуцировались изоферменты β -1,3-глюканазы с pI 7.2 и 8.0. Среди хитиназ стебля происходила индукция кислых изоферментов (pI 3.1, 3.5).

Представленные данные свидетельствуют о специфичности элиситорных свойств ХГК и ХОС в индуцирующем эффекте на изоферменты β -1,3-глюканазы и хитиназы проростков пшеницы. Результаты могут быть использованы в биохимии взаимодействия растений и фитопатогенных грибов.

Введение. К настоящему времени накоплен большой фактический материал об индукции в растениях в ответ на инфицирование вирусами, бактериями и грибами синтеза многих новых белков, так называемых патогенез-связанных, или PR-белков. Эти белки классифицированы в 17 семейств в соответствии с их структурой и свойствами [1]. Особое внимание в связи с изучением механизмов защиты растений от фитопатогенов уделяется PR β -1,3-глюканазам (ЕС 3.2.1.39) и хитиназам (ЕС 3.2.1.14), способным разрушать клеточные стенки грибов [2].

Гидролиз полисахаридов клеточных стенок (хитин-глюкановый комплекс) грибных патогенов, приводящий к образованию элиситор-активных фрагментов, является основной функцией β -1,3-глюканаз и хитиназ, способствуя индукции других защитных реакций. По своей природе большинство известных элиситоров относится к углеводам. В своем обзоре Shibuya N. и Minami E. [3] приводят сведения о доказанных элиситорных свойствах таких веществ, как β -глюкан, хитин, хитозан, их олигосахариды, а также олигогалактурониды.

Углеводистые элиситоры распознаются рецепторными сайтами на поверхности плазматической мембраны растения-хозяина и являются триггерами защитного ответа растения [4, 5]. Расщепляющее действие хитиназ на структуру хитиновых полимеров приводит к образованию хитозан-подобных веществ, накапливающихся особенно внутри гифов. Хитозан обладает высокой ингибиторной активностью в отношении прорастания уредоспор и роста гриба [6]. Олиго- и полимерный хитозан также эффективно индуцирует резистентность путем активации генов защитного ответа [7, 8]. Следует отметить, что элиситоры индуцируют фитоалексины в крайне низких концентрациях, составляющих 10^{-9} и даже 10^{-13} М [9].

Элиситоры имеют важное значение в клеточной сигнализации, индуцировании фитоалексинов, активации защитных генов и белков растения. Обычно это либо поверхностные, либо выделяемые паразитом вещества, т. е. именно те соединения, которые первыми соприкасаются с поверхностью растения. Помимо упомянутых углеводов, ими могут быть гликопротеины, липополисахариды, липогликопротеиды и др. [10].

К настоящему времени наиболее изученными являются элиситоры аминсахаридной природы, такие как хитин, хитозан и разнообразные их производные - хитоолигосахариды. Проявление элиситорных свойств строго зависит от размера и структуры углевода, количества аминных групп, их расположения и т.д. [11]. Так, например, сравнили олигомеры GlcNAc от тетрамера до декамера, GlcN от пентамера до гептамера, а также N-ацетилированные хитозаны со степенью ацетилирования 1%, 15%, 35%, 60% и степенью полимеризации (СП) от 540 до 1100 по элиситорному эффекту на активность фенил-аммоний лиазы (ФАЛ), пероксидазы (ПО), отложение лигнина и некроз листьев пшеницы. Олигомеры GlcN не обладали элиситорным эффектом, тогда как GlcNAc олигомеры с СП > 7 индуцировали ПО, но не ФАЛ. Частично N-ацетилированные полимерные хитозаны активировали ПО и ФАЛ. Максимум действия проявлял хитозан со средней СП. Хитозаны, но не хитин олигомеры, вызывали отложение лигнина и некрозис. Данные указывают на разные механизмы индукции ферментов, участвующих в лигнификации и некрозисе [12].

Были исследованы различия между хитозаном массой 350 кДа и олигохитозаном (6 кДа) в ингибиторном действии на фитопатогенные грибы. Оба агента сильно тормозили прорастание спор и рост мицелия *Alternaria kikuchiana* и *Physalospora piricola*. Хотя олигохитозан имел лучшее ингибиторное действие на грибковую патогенность *in vitro*, хитозан был более эффективным в контроле болезни. Кроме того, при обработке олигохитозаном увеличивалась активность хитиназы, β -1,3-глюканазы и пероксидазы [13]. Эти результаты свидетельствуют о том, что хитозан и олигохитозан запускают разные механизмы для ингибирования патогенности и контроля болезни.

Данная работа посвящена малоизученному аспекту - действию хитин-глюканового комплекса клеточных стенок гриба *Fusarium graminearum* и хитозан олигосахарид на активацию β -1-3-глюканазы и хитиназы, а также их отдельных изоферментов в проростках пшеницы.

Материалы и методы. Объектами исследования служили 5-ти дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Шортландинская. Проростки обрабатывали различными концентрациями хитин-глюканового комплекса (ХГК) клеточных стенок (КС) гриба *F. graminearum*, полученного в лаборатории и хитозан олигосахарид (ХОС) с массой 5000 Да (Sigma, США) в течение 2-24 ч в стерильных условиях.

Препарат клеточных стенок гриба получали следующим образом. Мицелий после отделения от культурального фильтрата тщательно отмывали водой (7-8 раз), затем 0,1 М NaCl (2-3 раза) и 0,5 М NaCl (4-5 кратная промывка). Не разрушенный мицелий гомогенизировали в блендере с 200 мл 0,5М раствора NaCl и центрифугировали при 3000g. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок растворяли в следующей порции 0,5 М NaCl. Стадию очистки солями повторяли 5-7 раз. Полученный осадок КС отмывали от солей водой (5-7 кратная отмывка) и высушивали. Липофильные и другие полярные компоненты КС экстрагировали этиловым спиртом 24 ч при 22-25°C в соотношении 1/50. КС высушивали лиофильно и хранили при 4-8°C.

Для получения ХГК к 0,5 г КС добавляли 20мл 0,05М ацетатного буфера pH 5.6, содержащего 50 мг целлюлазы (Sigma, США). Взвесь перемешивали и инкубировали 4 ч при 50-51°C. После инкубации взвесь центрифугировали 10 мин при 12000g. КС отделяли и повторяли ферментативный гидролиз в вышеописанных условиях. Супернатант отбирали и инактивировали целлюлазу кипячением на водяной бане при 100°C 7 мин. Смесь охлаждали, выпавший осадок фермента центрифугировали 10 мин при 12000g и отбрасывали. Объединенные фракции гидролизата КС концентрировали в вакуумном испарителе при 37-40°C и лиофильно высушивали.

Активность β -1,3-глюканазы определяли колориметрически по методу [14], а хитиназы - по методу [15]. Нативное изоэлектрофокусирование (ИЭФ) β -1,3-глюканазы и хитиназы проводили в пластинах 5% ПААГ толщиной 1 мм с помощью прибора Multiphor II (LKB, Швеция). В качестве амфолитов использовали Servalyt pH 3-10 (Serva, Германия). Окрашивание пластины ПААГ на

хитиназную активность проводили по методу [16], а проявление зон активности β -1,3-глюканазы - по методу [17].

Результаты исследований

Хитин-глюкановый комплекс клеточных стенок *F. graminearum* с массой частиц 2-10 кДа получали ферментативным гидролизом и фракционированием гидролизата на ультрафильтрационной ячейке Amicon (Millipor, США). В работе исследовалось действие 2-х фракций: 20-10 и 10-4 глюкозных остатков. Контролем служили проростки, инкубируемые на дистиллированной воде.

В стеблях под действием 1-й и 2-й фракций ХГК максимальная глюканазная и хитиназная активность наблюдалась на более поздних сроках инкубации (8 и 16 ч). В отличие от стеблей, в корнях активация обоих ферментов происходила двумя выраженными пиками значений – в начальный (на 2 и 4 ч) и более поздний период - на 16 ч (рисунок 1).

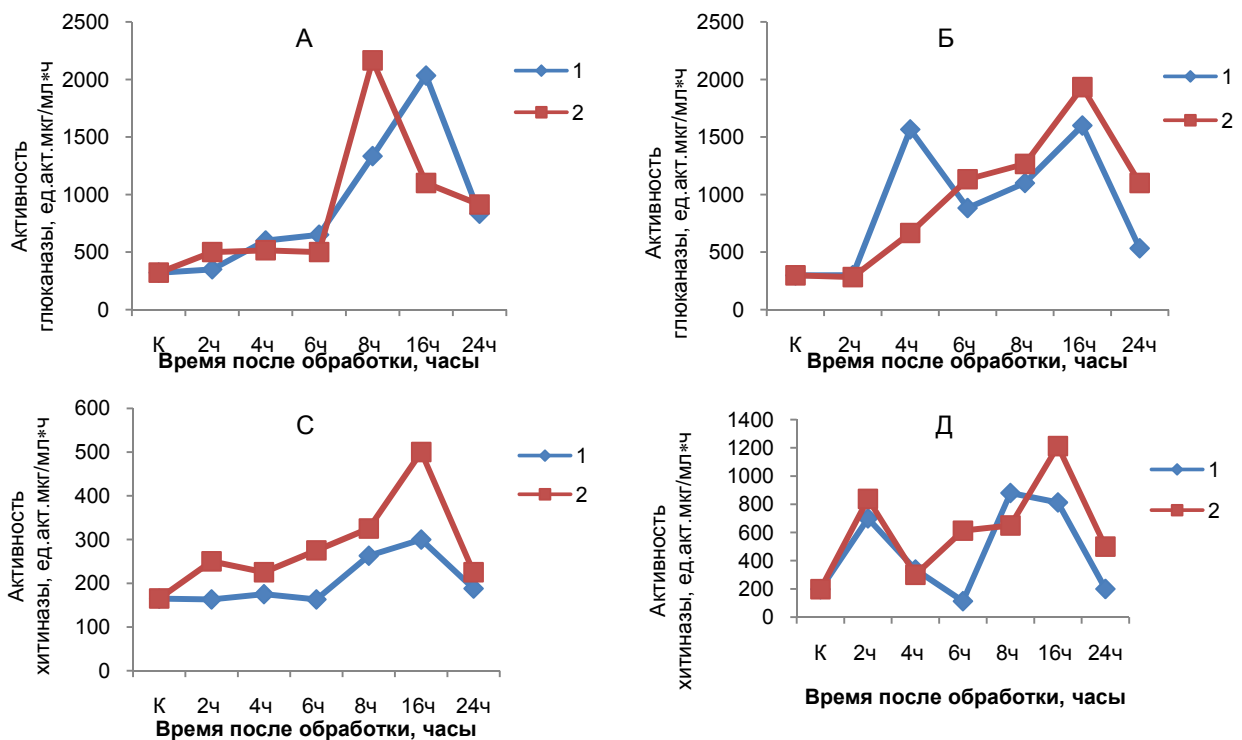


Рисунок 1 – Влияние ХГК КС *F. graminearum* на активность β -1,3-глюканазы и хитиназы проростков пшеницы:

А и С – стебель, Б и Д – корень;

1 – 20-10 глюкозных остатков, 2 – 10-4 глюкозных остатков

Картина влияния ХГК на изоферментном уровне представлена на рисунке 2. Видно, что с увеличением продолжительности действия этого агента возрастал синтез β -1,3-глюканазы в стеблях и корнях. При этом можно отметить, что в корне после 2 ч обработки происходил синтез *de novo* изофермента с pI 3.3, а после 16 ч - компонента с pI 7.8 (рисунок 2А). Кроме того, в обоих органах происходила активация изоформ с pI 5.2, 5.4 и 6.3. В ИЭФ спектре хитиназы (рисунок 2Б) наблюдалась индукция кислых изоформ с pI 3.1 и 3.5 как в корне, так и стебле, а также активация компонентов с pI 4.3 и 7.8 в корне.

Исследовано действие хитозан олигосахарида на индукцию β -1,3-глюканазы и хитиназы в проростках пшеницы. ХОС повышал глюканазную активность в стебле и корне в ранний (2-4 ч) период инкубации. Второй пик активности отмечен позже - на 16 ч инкубации (рисунок 3 А,Б). В концентрации 1 мг/мл воздействие ХОС было больше на 20%, чем при концентрации 0,1 мг/мл. Увеличение активности хитиназы (свыше 3-х крат) в стебле происходило после 2 ч обработки

олигосахаридом. В корне также наблюдалось 2-х фазная индукция фермента - после 2 и, особенно, 16 ч инкубации с 1 мг/мл ХОС (рисунок 3С, Д).

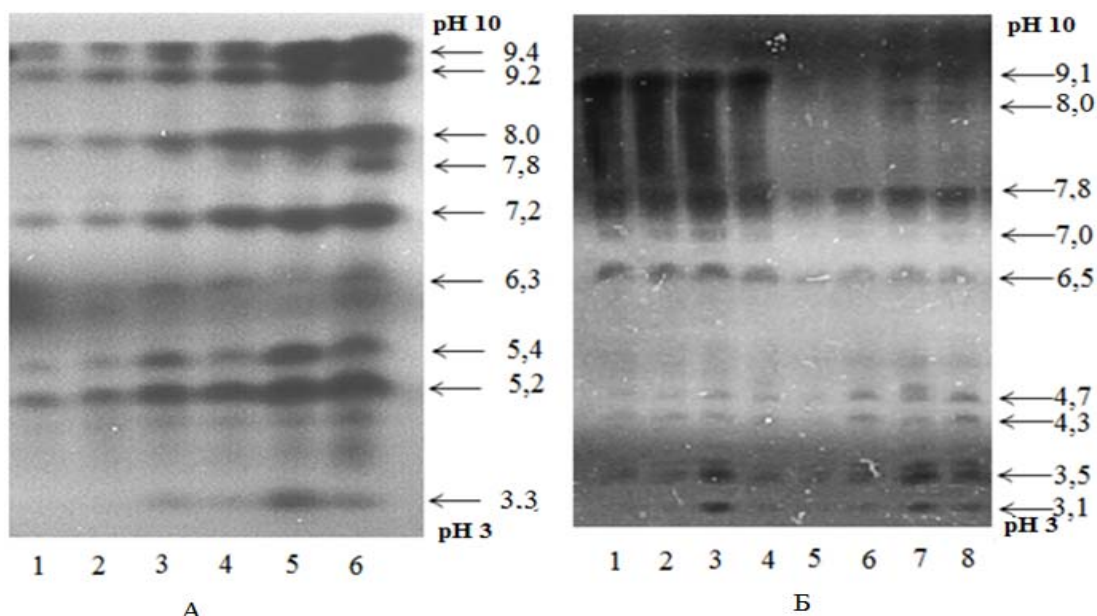


Рисунок 2 – Влияние ХГК КС *F. graminearum* на ИЭФ-спектр β -1,3-глюканазы (А) и хитиназы (Б) проростков пшеницы: А: 1 – исходный стебель; 2 – фракция 2, 2 ч; 3 – фракция 2, 8 ч; 4 – исходный корень; 5 – фракция 2, 6 ч; 6 – фракция 2, 16 ч; Б: 1 – исходный стебель; 2 – фракция 2, 2 ч; 3 – фракция 1, 16 ч; 4 – фракция 2, 16 ч; 5 – исходный корень; 6 – фракция 2, 2 ч; 7 – фракция 1, 8 ч; 8 – фракция 2, 16 ч

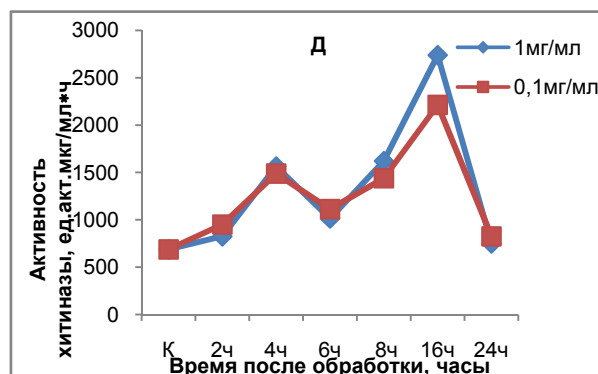
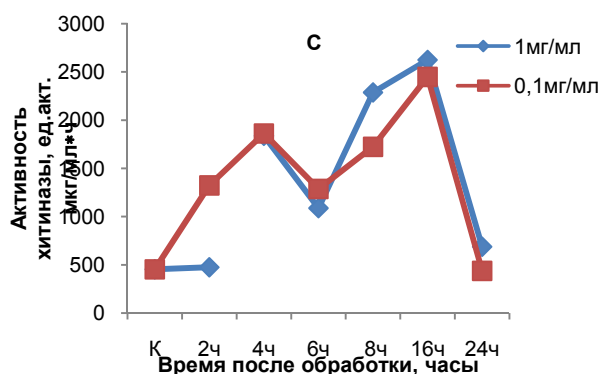
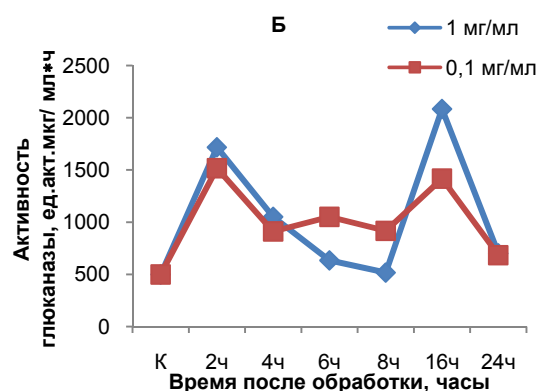
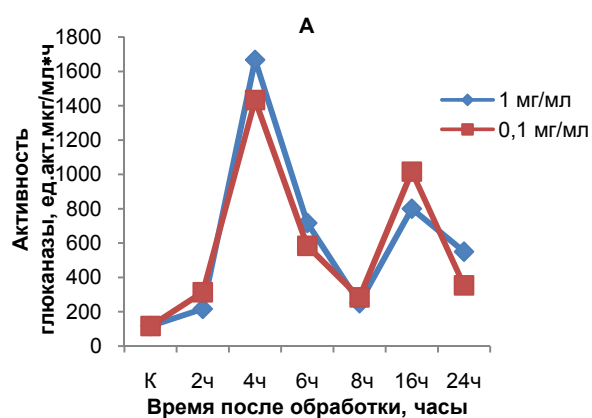


Рисунок 3 – Влияние ХОС на активность β -1,3-глюканазы и хитиназы проростков пшеницы:
А, С – стебель; Б, Д – корень

На рисунке 4 А,Б представлены результаты ИЭФ β -1,3-глюканазы стеблей и корней пшеницы. Видно, что под действием ХОС усиливались изоферменты с рI 5.2 и 5.4 в обоих органах, а также щелочной компонент с 9.1 в стебле. Особо следует отметить индукцию в обоих органах синтеза de novo 2-х изоформ с рI 7.2 и 8.0. В составе хитиназы стебля происходила индукция и активация кислых изоферментов (рI 3.1, 3.5).

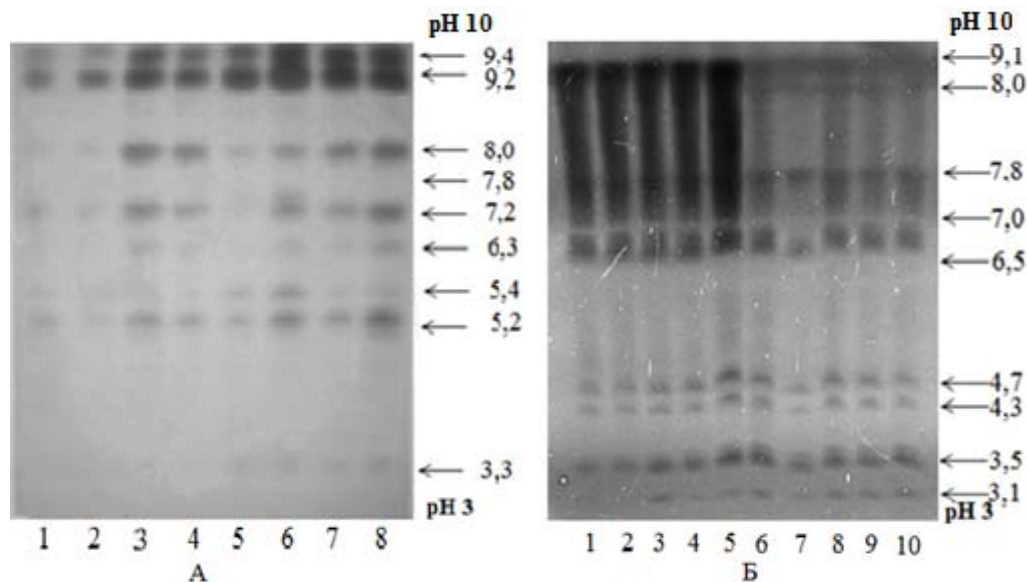


Рисунок 4 – Влияние ХОС на ИЭФ-спектр β -1,3-глюканазы (А) и хитиназы (Б) проростков пшеницы:
А: 1 – исходный стебель; 2 – 2 ч; 3 – 4 ч; 4 – 16 ч; 5 – исходный корень; 6 – 2 ч; 7 – 4 ч; 8 – 16 ч;
Б: 1 – исходный стебель; 2 – 0,1 мг/мл ХОС, 2 ч; 3 – 0,1 мг/мл, 4 ч; 4 – 1 мг/мл, 8 ч; 5 – 1 мг/мл, 16 ч;
6 – исходный корень; 7 – 1 мг/мл, 2 ч; 8 – 1 мг/мл, 4 ч; 9 – 1 мг/мл, 8 ч; 10 – 1 мг/мл, 16 ч

В отличие от хитин-глюканового комплекса и хитозан олигосахарида другие испытанные нами углеводистые полимеры, входящие в состав клеточных стенок – ламинарин, хитин (в коллоидной форме), целлюлоза и ее водорастворимые производные, не оказывали существенного действия на β -1,3-глюканазу и хитиназу проростков пшеницы.

Обсуждение результатов. Исследовано влияние хитин-глюканового комплекса клеточных стенок *F. graminearum* и хитозанолигосахарида массой 5 кДа на активность β -1,3-глюканазы и хитиназы проростков пшеницы. При воздействии ХГК в стеблях максимум глюканазной и хитиназной активности наблюдался на поздних сроках инкубации (8-16 ч). В корнях активация обоих ферментов происходила 2-мя пиками значений – в начальный (2 и 4 ч) и поздний (16 ч) периоды. Похожим элиситорным эффектом на проростки пшеницы обладал олигосахарид хитозана. Однако в присутствии этого агента 2-х фазный характер активизации ферментов был более четко выраженным.

На изоферментном уровне ХГК КС вызывал в корне синтез de novo компонентов β -1,3-глюканазы с рI 3.3 и 7.8, а в составе хитиназы - изоформ с рI 3.1 и 3.5. В присутствии ХОС в обоих органах индуцировались 2 изофермента β -1,3-глюканазы с рI 7.2 и 8.0. Среди хитиназ стебля, как и в случае с ХГК, происходила индукция кислых изоферментов (рI 3.1, 3.5).

Таким образом, гидролизат клеточных стенок гриба *F. graminearum* и хитоолигосахарид обладают индуцирующим действием на пшеничные проростки, вызывая в них появление и усиление синтеза ряда изоферментов хитиназ и глюканаз. В отличие от ХГК и ХОС, другие испытанные полимеры ламинарин, хитин, целлюлоза, а также водорастворимые фрагменты целлюлозы, не оказывали существенного влияния на активность и состав глюканазы и хитиназы проростков пшеницы.

Представленные данные свидетельствуют об особенностях в специфичности элиситорных свойств компонентов хитин-глюканового комплекса и хитозан олигосахаридов среднего размера в индуцирующем эффекте на изоферменты β -1,3-глюканазы и хитиназы проростков пшеницы. Полученные результаты подтверждают важность структуры и размерности соединений в проявлении элиситорных свойств.

Источник финансирования исследований. Министерство образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ebrahim S., Usha K., Singh B. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism // In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A. Mendez-Vilas (ed.) 2011. P. 1043-1054.
- [2] Sharma V. Pathogenesis related defence functions of plant chitinases and β -1,3-gluconases // *Vegetos*. 2013. Vol. 26. P. 205-218.
- [3] Shibuya N., Minami E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001. Vol. 59. P. 223-233.
- [4] Okada M., Matsumara M., Ito Y., Shibuya N. High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley, and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor // *Plant Cell Physiol.* 2002. Vol. 43(5). P. 505-512.
- [5] Hanae K., Yoko N., Naoko I-M., Chiharu A-T., Naoshi D., Koji T., Eiichi M., Naoto Sh., Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor // *PNAS*. 2006. Vol. 103 (29). P. 11086-11091.
- [6] Xu J.G., Zhao X.M., Han X.W., Du Y.G. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro // *Pesticide Biochem. Physiol.* 2007. Vol. 87. P. 220-228.
- [7] Ning W., Chen F., Mao B.Z., Li Q., Lui Zh.X., Guo Z.J., He Z.H. N-acetylchitooligosaccharides elicit rice defence responses including hypersensitive response-like cell death, oxidative burst and defence gene expression // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004. Vol. 64. P. 263-271.
- [8] Amboraber B-E., Bonmort J., Fleurat-Lessard P., Roblin G., Early events induced by chitosan on plant cells // *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59(9). P. 2317-2324.
- [9] Mishra A.K., Sharma K., Misra R.S. Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants // *J. Plant Interact.* 2012. Vol. 7(2). P. 95-120.
- [10] Дьяков Ю.Т. Грибные элиситоры // *Мат. VII Всерос. микологич. школы-конф. с междунар. участием «Биотические связи грибов: мосты между царствами».* Изд-во МГУ, 2015. – С. 18-38.
- [11] No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights // *Int. J. Food Microbiol.* 2002. Vol. 74(1-2). P. 65-72.
- [12] Vander P., Varum K., Domard A., Gueddari N-E., Moerschbacher B. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves // *Plant Physiol.* 1998. Vol. 118. P. 1353-1359.
- [13] Meng X., Yang L., Kennedy J., Tian S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit // *Carbohydrate Polymers*. 2010. Vol. 81. P. 70-75.
- [14] Nichols E.J., Beckman J.M., Hadwiger L.A. Glycosidic enzyme activity in pea tissue and pea-*Fusarium solani* interactions // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 66. P. 199-204.
- [15] Fink W., Liefland M., Mendgen K. Chitinases and β -1,3-gluconases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.) // *Plant Physiol.* 1988. Vol. 88. P. 270-275.
- [16] Trudel J., Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis // *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 178. P. 362-366.
- [17] Shen Q. Pan, Xiang S.Ye, Kuc J. A technique for detection of chitinase, β -1,3-gluconases, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing // *Phytopathology*. 1991. Vol. 9(9). P. 970-974.

REFERENCES

- [1] Ebrahim S., Usha K., Singh B. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A.Mendez-Vilas (ed.) 2011. P. 1043-1054.
- [2] Sharma V. *Vegetos*. 2013. Vol. 26. P. 205-218.
- [3] Shibuya N., Minami E. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001. Vol. 59. P. 223-233.
- [4] Okada M., Matsumara M., Ito Y., Shibuya N. *Plant Cell Physiol.* 2002. Vol. 43(5). P. 505-512.
- [5] Hanae K., Yoko N., Naoko I-M., Chiharu A-T., Naoshi D., Koji T., Eiichi M., Naoto Sh., *PNAS*. 2006. Vol. 103 (29). P. 11086-11091.
- [6] Xu J.G., Zhao X.M., Han X.W., Du Y.G. *Pesticide Biochem. Physiol.* 2007. Vol. 87. P. 220-228.
- [7] Ning W., Chen F., Mao B.Z., Li Q., Lui Zh.X., Guo Z.J., He Z.H. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004. Vol. 64. P. 263-271.
- [8] Amboraber B-E., Bonmort J., Fleurat-Lessard P., Roblin G., *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59 (9). P. 2317-2324.
- [9] Mishra A.K., Sharma K., Misra R.S. *J.Plant Interact.* 2012. Vol. 7 (2). P. 95-120.
- [10] Dyakov Y.T. *Mat. VII Vseros. micologich. shcoly – conf. s mezhdunar. uchastiem «Bioticheskie sviyazi gribov: mosty mezhdu tzarstvami».* Izd. MGU, 2015. S. 18-38.
- [11] No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. *Int. J. Food Microbiol.* 2002. Vol. 74(1-2). P. 65-72.
- [12] Vander P., Varum K., Domard A., Gueddari N-E., Moerschbacher B. *Plant Physiol.* 1998. Vol. 118. P. 1353-1359.
- [13] Meng X., Yang L., Kennedy J., Tian S. *Carbohydrate Polymers*. 2010. Vol. 81. P. 70-75.

- [14] Nichols E.J., Beckman J.M., Hadwiger L.A. Plant Physiol. 1980. Vol. 66. P. 199-204.
[15] Fink W., Liefeland M., Mendgen K. Plant Physiol. 1988. Vol. 88. P. 270-275.
[16] Trudel J., Asselin A. Anal. Biochem. 1989. Vol. 178. P. 362-366.
[17] Shen Q. Pan, Xiang S. Ye, Kuc J. Phytopathology. 1991. Vol. 9(9). P. 970-974.

**ХИТИН-ГЛЮКАНДЫ КЕШЕНІ МЕН ХИТОЗАН ОЛИГОСАХАРИДТІҢ
БИДАЙ ӨСКІНДЕРІНДЕГІ β -1,3-ГЛЮКАНАЗА ЖӘНЕ
ХИТИНАЗА БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ӘСЕРІ**

**А. Дәлелханқызы, Н. С. Мамытова, Ж. Д. Бескемпірова,
Б. Тілеген, В. А. Кузовлев, А. А. Хакімжанов**

ҚР БҒМ ҒК М. А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты,
Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: бидай өскіндері, β -1,3-глюканаза, хитиназа, изоферменттер, индукция, хитин-глюкан кешені, хитозанолигосахарид

Аннотация. Элиситорлар – өсімдіктерді саңырауқұлақ патогенінен қорғауда маңызды қызмет атқаратын арнайы заттар. Олардың арасында көбірек танылғаны β -глюкан, хитин, хитозан және олардың олигомерлі туындылары сияқты көмірсулы заттар. Элиситорлар жасушаның сигналдық трансдукциясында, фитоалексиндерді индуцирлеуде және қорғаныс гендерінің, сондай-ақ патогенездерімен байланысты PR – ақуыздарының белсенділігін арттыруда маңызды рөл атқарады. Соңғысының құрамында саңырауқұлақтардың жасуша қабығын бұзуға қабілетті β -1,3-глюканаза және хитиназа гидролитикалық ферменттері ерекше орын алады.

Бұл жұмыс аз зерттелген аспектілер – *Fusarium graminearum* саңырауқұлағының жасушалық қабығының (ЖҚ) хитин – глюкан кешенінің (ХГК) және хитозан олигосахаридтің (ХОС) бидай өскініндегі β -1,3-глюканаза және хитиназа ферменттерінің индукциясы және белсенділігіне арналған. Осы аминокөмірсулы агенттер сабақ пен тамырдағы глюканаза және хитиназа белсенділігін – бастапқы (2 және 4 сағат) және соңғы кезеңінде – 16 сағатта жоғарылататыны анықталды. Алайда ХОС әсер еткенде ферменттердің 2 фазалық белсенділігі біршама анық байқалған. Изоферментті деңгейде ХГК тамырда β -1,3-глюканазаның рІ 3.3 және 7,8 компоненттерінің, ал хитиназа құрамының – рІ 3.1 және 3.5 изоформаларының de novo синтезін тудырды. ХОС қатысында аталған мүшелерде β -1,3-глюканазаның рІ 7.2 және 8.0 изоферменттері индуцирленді. Сабақта хитиназаның қышқылдық изоферменттерінің (рІ 3.1, 3.5) индукциясы жүрді.

Келтірілген мәліметтер ХГК мен ХОС бидай өскініндегі β -1,3-глюканаза және хитиназа изоферменттеріне индуцирлік әсер етіп, ерекше элиситорлық қасиет көрсететіні дәлелдеді. Нәтижелер өсімдіктер мен фитиопатогенді саңырауқұлақтардың өзара қарым-қатынасы энзимологиясында пайдаланылуы мүмкін.

Поступила 04.05.2016 г.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 24.05.2016.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
9,5 п.л. Тираж 300. Заказ 3.