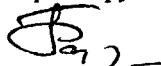


На правах рукописи

 2

ГАГАРИНА ИРИНА НИКОЛАЕВНА

**БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС СЕМЯН ФАСОЛИ И ИСПЫТАНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЕГО КОМПОНЕНТОВ**

03.00.23 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Орел – 2005

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет» и Всероссийском научно-исследовательском институте зернобобовых и крупяных культур РАСХН.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Павловская Нинель Ефимовна

Официальные оппоненты: доктор сельскохозяйственных наук,
профессор
Лысенко Николай Николаевич

кандидат биологических наук,
Гольшикина Любовь Владимировна

Ведущая организация: **ГОУ ВПО «Орловский
Государственный университет»**

Защита состоится «3» декабря 2006 г. в 14.30 часов
на заседании диссертационного совета КМ 220.052.01 в ФГОУ ВПО
«Орловский государственный аграрный университет» по адресу:
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Орловского
государственного аграрного университета.

Автореферат разослан «30» декабря 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент  **Макеева Т.Ф.**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Приоритетной задачей биотехнологии является обеспечение сельскохозяйственного производства дешевыми, экологически чистыми и эффективными препаратами для обработки посевного материала, гарантирующие формирование высоких и стабильных урожаев. С целью выявления дополнительного источника биологически активных веществ многие ученые мира занимаются биоскринингом растений. Фасоль является одним из таких объектов. По химическому составу семена фасоли уникальны и включены в группу важных продуктов, обеспечивающих население полноценным белком. Однако белковый комплекс фасоли содержит ряд токсичных и антиалimentарных факторов питания, блокирующих активность пищеварительных ферментов, которые и, возможно, принимают участие в защитных механизмах растения. Наличие антипитательных веществ (ингибиторов гидролаз, лектинов и цианогенных гликозидов) с высокой активностью в семенах фасоли делает ее перспективной с точки зрения биотехнологической переработки и получения фитопрепаратов.

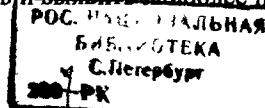
Диапазон применения белковых компонентов растений достаточно широк. В проспектах ведущих химических и биотехнологических фирм мира, специализирующихся в сфере выпуска биопрепаратов, можно найти большой перечень лектинов, меченых лектинов, ингибиторов и их производных, необходимых для производства лекарственных средств и диагностикумов.

Для разработки технологий получения в промышленных масштабах лектинов и ингибиторов фасоли необходимо не только выявить перспективные сорта и формы, но и установить фазу развития, их локализацию в органах растения, изучить химический состав сопутствующих веществ, рассчитать выход и дать конкретные рекомендации по методикам выделения. Решение этих проблем позволит дополнить знания в области биохимии фасоли и будет способствовать дальнейшему повышению рентабельности сельскохозяйственного производства.

Цель и задачи исследований. Цель работы – охарактеризовать белковый комплекс семян фасоли и испытать его антипитательные компоненты: ингибиторы гидролаз и лектины на биологическую активность.

Задачи:

1. Провести биоскрининг сортов и форм фасоли на содержание белка, антипитательных и токсичных веществ и выявить наиболее пер-



спективные для промышленного получения лектинов и ингибиторов гидролаз.

2. Изучить динамику накопления токсичных веществ: лектинов, ингибиторов гидролаз и цианидов по фазам развития семян у различных сортов и форм фасоли.

3. Выявить полиморфизм образцов фасоли по белковым и ДНК-маркерам.

4. Выделить и очистить ингибиторы гидролаз и лектины из семян фасоли.

5. Установить полипептидный состав ингибиторов гидролаз, лектинов и углеводную составляющую лектинов.

6. Провести испытание белковых компонентов фасоли на биологическую активность.

7. Сформулировать рекомендации по рациональному использованию лектинов и ингибиторов гидролаз фасоли.

Научная новизна работы. Впервые проведен биоскрининг районированных сортов и форм фасоли на содержание и активность антипитательных и токсичных веществ: лектинов, ингибиторов гидролаз и цианидов, осуществлена регистрация местных сортов и форм фасоли по белковым и ДНК – маркерам. Выделены лектины и ингибиторы протеиназ и амилаз из семян фасоли, установлен полипептидный и углеводный состав, испытана их биологическая активность.

Практическая значимость работы. Выявлены сорта и формы фасоли с высокой активностью лектинов и ингибиторов с целью использования их в качестве сырья для промышленного получения препаратов различного назначения, в том числе и диагностикумов для определения групп крови человека. Предложены модифицированные и адаптированные к изучаемой культуре биотехнологические схемы выделения лектинов и ингибиторов. Установлено положительное влияние компонентов фасоли на урожайность и устойчивость к патогенам и фитофагам гороха *Pisum sativum*, что является перспективным направлением в создании биопестицидов.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены: на 1-ом Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002), на V съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Физиология растений - основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003), на международном форуме «Биотехнология и современность» (Санкт – Петербург, 2003), на 2-ом Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2003), на научно практической конфе-

ренции молодых ученых и аспирантов «Биологические основы современной агрономии» (Орел, 2004), на международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), на 3-ем Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, предложений для производства, приложения, списка литературы, включающего 114 отечественных и 71 иностранный источник. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 31 рисунком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертационная работа выполнена в период с 2001-2005 г.г. в рамках программ: 1. ГНЦ З. (2003г.) по теме: «Разработка методов повышения иммунных свойств, диагностики и интегрированных систем защиты зернобобовых и крупяных культур от болезней и вредителей»: 3.4. «Влияние белковых компонентов фасоли на иммунные свойства гороха»; 2. (2004 г.) «Разработка методов диагностики и повышения иммунных свойств на основе биологических систем защиты зернобобовых и крупяных культур от болезней и вредителей»: 2.4. «Выявление природных сигнальных систем устойчивости гороха»; программы РАСХН 08.02.03. «Провести комплексную биохимическую и технологическую оценку генофондов зернобобовых (горох, фасоль, чечевица, вика яровая, кормовые бобы) и крупяных культур (гречиха, просо), выделить источники высокой белковости, отличных пищевых и кормовых достоинств, провести паспортизацию сортов гороха, фасоли, просо и гречихи по белковым формулам и ДНК-маркерам». Экспериментальная работа проводилась в НИИЛ ОГАУ, опытные посевы размещены во ВНИИ ЗБК.

Материалом исследований являлись образцы фасоли селекции ВНИИ ЗБК (11) и коллекций ВИР (13), всего 24 образца. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

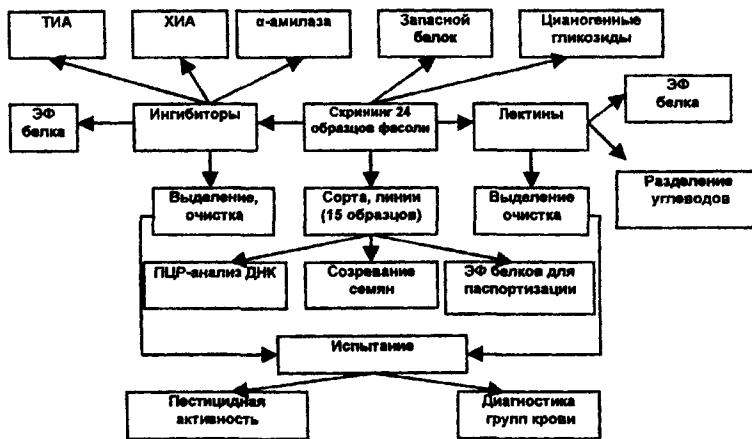


Рис. 1. Схема эксперимента

Содержание сырого протеина в семенах фасоли определяли методом Кильдаля; гемагглютинирующую активность - по Э.И. Выскребенцевой (1983); активность ингибиторов протеиназ - казеинолитическим методом М.Л. Какейда (Бенкен, 1982); активность α -амилазы - спектрофотометрическим методом в модификации А.И. Ермакова (1983); идентификацию и регистрацию образцов фасоли – по полипептидному составу белков в созревающих семенах методом SDS-ПААГ электрофореза по прописи ВИРа (Конарев и др. 2000) в модификации; идентификацию образцов по ДНК маркерам - методом ПЦР; статистическую обработку результатов проводили методами дисперсионного анализа (Доспехов, 1985) с использованием компьютерных программ «Excel» и «Biostest -D».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Скрининг образцов фасоли на содержание сырого протеина, антипитательных и токсичных веществ. Исследования 2001-2003 г.г показали, что содержание белка по годам выращивания в зависимости от генотипа варьирует в довольно широких пределах (от 19,9 до 29,3%) и в среднем составляет 26%. В благоприятные по погодным условиям 2001 и 2003 г.г. содержание белка в семенах фасоли несколько выше и в среднем составляет 27%. В засушливых условиях 2002 г. этот показатель снижается до 23 %. Такие резкие колебания в накоплении протеина связаны не только с погодными условиями выращивания, но и с генотипом расте-

ний. Образцы фасоли с наиболее высоким содержанием протеина: Оран, Рубин, Ока, Шоколадница и Л-179 (28,4...29,1%) (табл. 1).

Таблица 1

Содержание белка в семенах фасоли
(% к абсолютно сухому веществу), 2001-2003 гг.

Название образца	Содержание белка, %			
	2001	2002	2003	Среднее
Оран	-	24,1	27,2	25,7
Рубин	-	22,9	26,4	24,7
Ока	-	27,1	29,1	28,7
Нерусса	-	24,2	26,1	25,2
Шоколадница	-	26,0	28,6	27,3
Бельская 16	29,3	23,9	28,4	27,2
Л 135	-	21,9	-	21,9
Л 162	24,3	20,1	-	22,2
Л 179	-	24,8	27,4	26,7
Л 202	-	21,7	24,2	23,0
Л 543	-	20,0	23,9	22,0
Л 714	-	23,1	25,7	24,4
К 13627	26,0	21,6	24,1	23,9
К 14098	27,9	26,1	-	27,0
К 15038	26,1	22,4	25,4	24,6
К 15077	28,9	25,2	28,1	27,4
К 15104	24,4	21,9	-	23,2
К 15121	25,8	20,9	-	23,4
К 15127	27,6	23,2	26,2	25,6
К 15175	27,1	22,9	-	25,0
К 15186	28,4	21,4	-	24,8
К 15196	29,9	27,2	29,1	28,7
Краснодарская 5	28,5	-	-	28,5
К 14694	25,5	21,9	-	23,7

Проведенный биоскрининг семян фасоли на гемагглютинирующую активность лектинов (ГА) выявил перспективные сорта и линии фасоли среди образцов коллекции ВИРа и ВНИИЗБК. Установлено, что образцы фасоли урожая 2001-2003 годов значительно различаются по ГА. Так, показатели активности по второй группе крови оказались самыми высокими на всех образцах ($33,33\ldots51,54 \text{ [мг/мл]}^{-1}$), актив-

нность лектинов с использованием третьей и четвертой групп крови примерно одинакова: ($21,22\ldots33,71 \text{ [г/мл}^{-1}]$) – по третьей, и ($2,22\ldots38,42 \text{ [мг/мл}^{-1}]$) - по четвертой), что несколько ниже показателей по второй группе. Данные по активности на первой группе оказались ниже других ($17,04\ldots27,82 \text{ [мг/мл}^{-1}]$).

По результатам биоскрининга дальнейшему исследованию подвергались 15 сортов и форм фасоли. Семена испытывали на ГА в различные фазы спелости семян (середина налива, полный налив, полная спелость), рис.2.

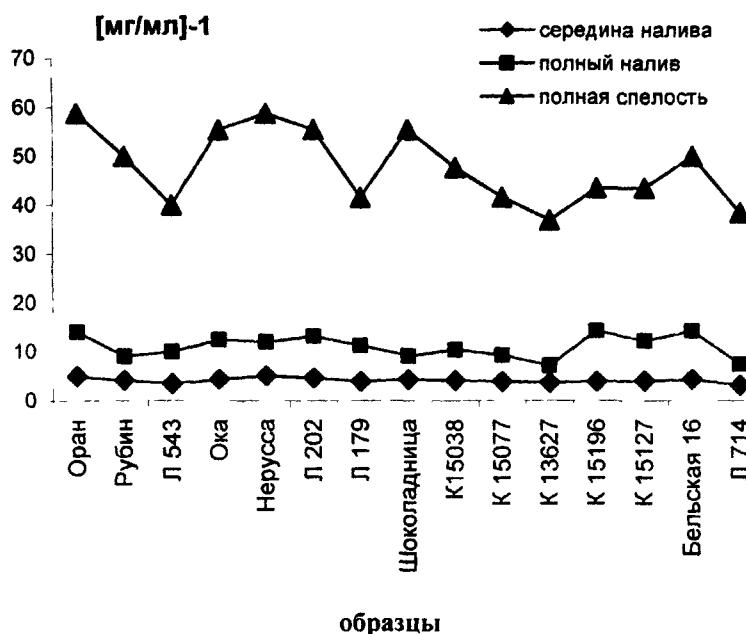


Рис. 2. Гемагглютинирующая активность лектинов в созревающих семенах фасоли на второй группе крови

В фазу середины налива активность лектинов низкая, в пределах $3,50 - 5,05 \text{ [мг/мл}^{-1}]$. Семена фасоли в фазу полного налива проявляют более высокую активность гемагглютининов (от $7,18$ до $14,38 \text{ [мг/мл}^{-1}]$). В процессе развития семян фасоли наблюдается увеличение ГА лектинов и своего максимума она достигает в фазу полной спелости ($58 \text{ [мг/мл}^{-1}]$).

Установлено, что наибольшей ГА обладали следующие сорта и образцы фасоли: Оран, Ока, Нерусса, Шоколадница (от 52,60 до 54,00 [мг/мл]⁻¹). Несколько ниже активность у сортов Рубин, Бельская 16, образцов Л 179, К 15038, К 15127 и К 15196 (от 40,00 до 47,60 [мг/мл]⁻¹), что позволяет рекомендовать их как сырье для получения лектинов.

Активность ингибиторов протеиназ в семенах фасоли незначительно изменялась по годам выращивания 2001 - 2003 г. г. (рис.3), что позволяет сделать вывод об отсутствии влияния внешних факторов на их накопление, и данный признак является генетическим, что подтверждают следующие данные.

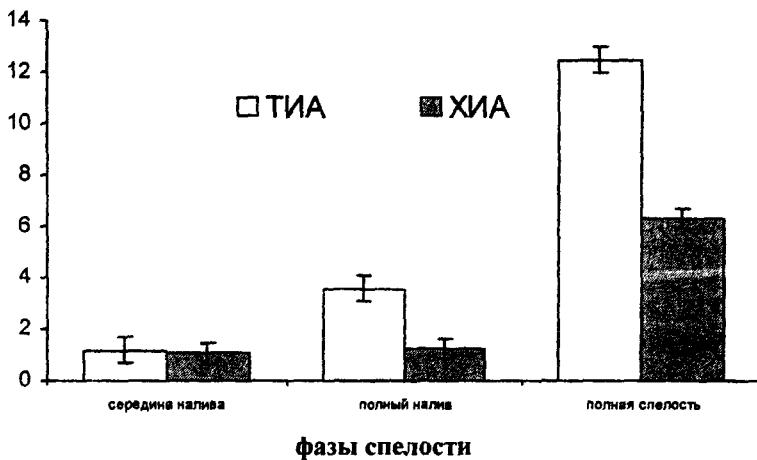


Рис. 3. Активность ингибиторов протеиназ семян фасоли
(среднее по годам)

С наибольшей активностью ингибиторов выделяются образцы Ока, Оран, Л – 179, Шоколадница. Трипсин ингибирующая активность (ТИА) изменяется в среднем от 9,02 до 12,00 мг/г. Химотрипсин ингибирующая активность (ХИА) несколько ниже и варьирует в пределах от 5,12 до 5,60 мг/г. Активность ингибиторов у других образцов ниже и составляет по ТИА (5,01...8,06), ХИА (3,58...5,01). В 2003 году исследованы семена фасоли в процессе их созревания. Величина ТИА в fazu середины налива составляет 1,2 мг/г; ХИА - 1,1 мг/г, в fazu полного налива ТИА - 3,5 мг/г, ХИА - 1,2 мг/г, а в fazu полной спелости активность достигает своего максимума (ТИА - 12,2 мг/г и ХИА - 6,5 мг/г).

Активность ингибиторов α – амилаз семян фасоли урожая 2001–2003 годов варьирует в пределах 74,4...96,8 %. Наибольшей активностью обладают сорта: Оран, Ока (92...96 %). В процессе созревания семян фасоли активность возрастает от фазы середины налива к полному наливу и несколько снижается к полной спелости. Так, у сорта фасоли Оран активность ингибиторов α – амилазы составляет: 18,2 мг/г (середина налива), 92,3 мг/г (полный налив) и 88,5 м/г (полная спелость).

Известно, что некоторые виды фасоли характеризуются наличием токсичных веществ, особенно лимарином, что делает их опасными для употребления в пищу в необработанном виде, поэтому было проведено исследование изучаемых образцов фасоли на содержание цианогенных гликозидов. В результате выявлено, что данный показатель находится в пределах ПДК (0,5...3,33 мг/100г).

Методы выделения и очистки лектинов и ингибиторов. Разработаны усовершенствованные методы выделения и очистки ингибиторов и лектинов применительно к фасоли, позволяющие увеличить выход компонентов, сократить время операции и повысить эффективность очистки. За основу выделения и очистки лектинов был принят метод А.В. Косенко (2002) на бобовых культурах. Базой способа выделения и очистки ингибиторов протеиназ является метод, разработанный И.О. Мельниковой (1982). Количественный метод определения ингибиторов α -амилаз по А.И. Ермакову (1983) для пшеницы адаптирован в новой биотехнологической схеме. Изменения внесены в следующие этапы: выделение белков, их центрифugирование, очистка, осаждение и др.

Данная технология позволяет получать лектины из семян фасоли с выходом 32 мг/100г белка, ингибиторы протеиназ - 18 мг/100г белка, α -амилаз – 14 мг/100г белка.

Характеристика суммарных запасных белков фасоли по полипептидному составу. Методом электрофореза изучен полипептидный состав запасных белков семян 15 образцов фасоли в разные фазы созревания (рис. 4). Для количественного выражения и сравнения образцов со стандартом (районированный сорт фасоли Оран) проведен компьютерный анализ белковых спектров в программе «Biotest – D». Показателем выраженности полипептидных зон является «светимость» в процентах.

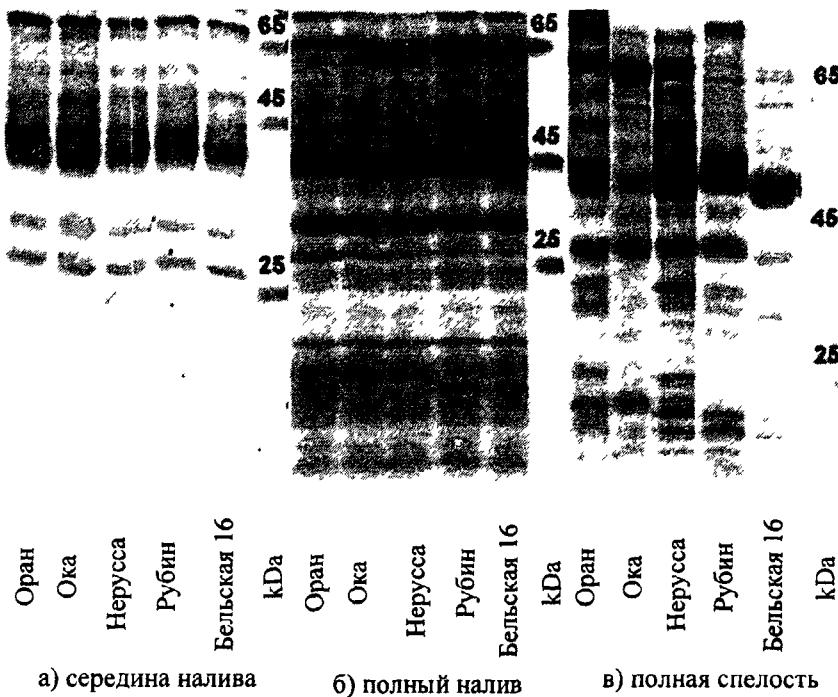


Рис. 4. Электрофореграммы полипептидного состава семян фасоли в процессе их созревания

Отличие полипептидного состава запасных белков семян разных образцов от стандартного сорта Оран в fazу середины налива минимально и составляет 0,2...0,5%. Полипептидный состав семян образцов фасоли в fazу полного налива отличается от стандарта на 11...14 %. Анализ семян полной спелости выявил еще большие различия (20...53 %) (рис. 5). Это указывает на эволюционное единство происхождения всех сортов фасоли, проявляющееся в первые сроки созревания семян, и дивергенцию признака у семян полной спелости. Данные исследования подтвердили имеющиеся литературные данные о сортоспецифичности запасных белков в fazе полной спелости, что делает обязательным идентификацию генотипов фасоли по полипептидному составу только зрелых семян.

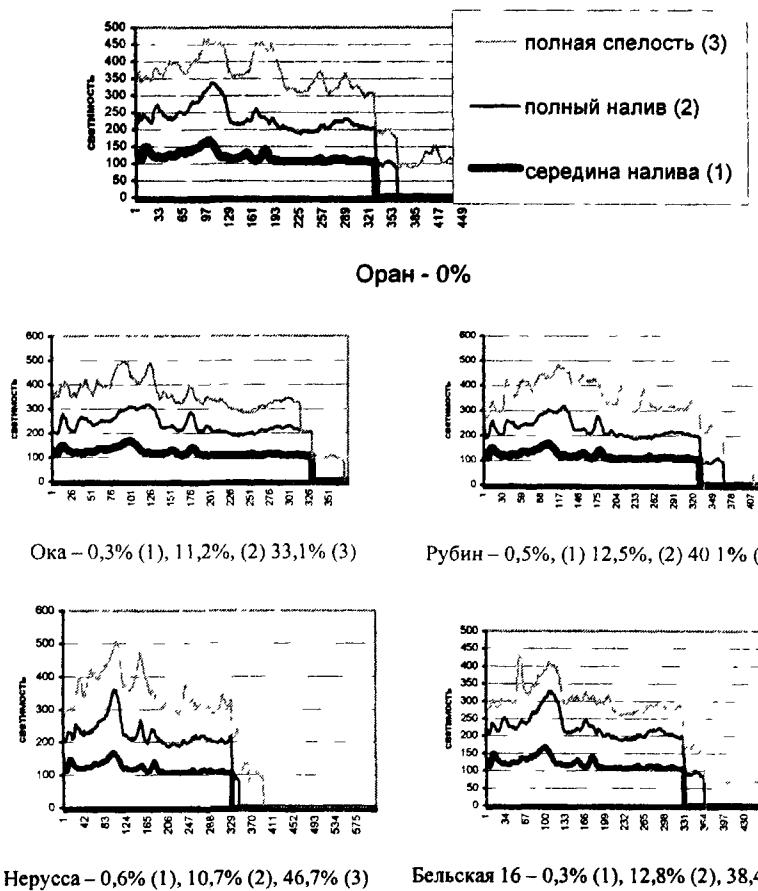


Рис. 5. Отклонение спектров полипептидного состава семян фасоли в процессе их созревания (от стандарта Оран)

Результаты электрофоретического разделения белков фасоли показывают, что линии состоят из одного биотипа, а сорта и коллекционные образцы из двух – трех. Определяющим по всем образцам является первый биотип, на долю которого приходится наибольший процент встречаемости. На основе исследований полипептидного состава семян различных сортов фасоли, выявивший их полиморфизм по данному признаку, составлен каталог белковых формул образцов фа-

соли, который может быть использован для паспортизации и идентификации сортов, осуществления контроля сортовой чистоты, решения арбитражных споров.

Полиморфизм сортов фасоли по ДНК-маркерам. Полиморфизм 15 образцов фасоли из коллекции ВИР и селекции ВНИИЗБК устанавливали по ДНК-маркерам ПЦР-анализом. Для амплификации геномной ДНК использовали праймеры 12 разновидностей в различной комбинации попарно и по одному. Сортовые различия найдены с праймером Bare (рис.6).

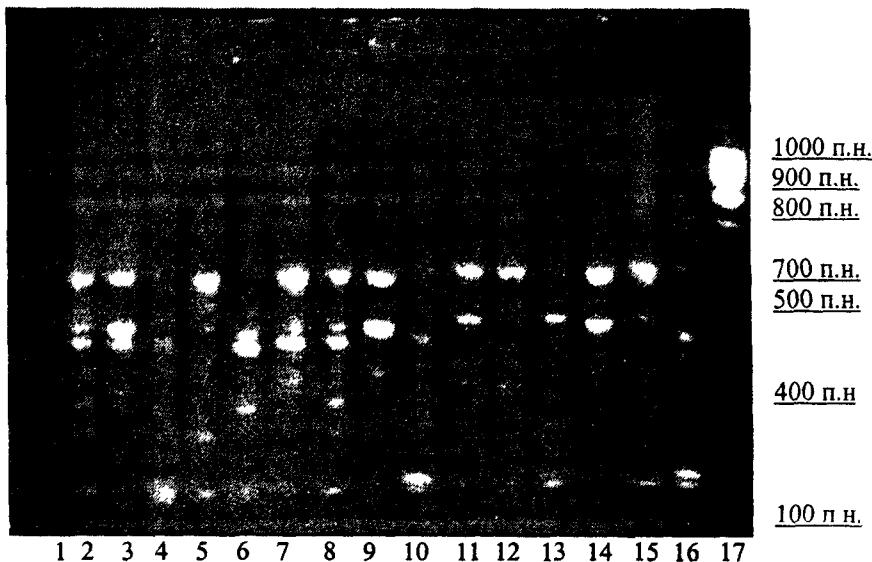


Рис. 6. Продукты амплификации ДНК образцов фасоли с праймером Bare (1-Контроль, 2-Оран, 3-Рубин, 4-Л 543/84, 5-Ока, 6-Неруса, 7-Л 202, 8-Л 714, 9-Л179, 10-Шоколадница, 11-К 15038, 12- К 15077, 13-К 13627, 14-К 15196, 15-К 15127, 16-Бельская, 17- Маркер).

Так, фрагменты продукта амплификации ДНК, соответствующие 500 – 700 п.н., характерны для всех сортов фасоли, а в зоне от 100 до 500 п.н. обнаружены фрагменты ДНК, дающие возможность выявлять межсортовой полиморфизм. Какой - либо связи между фрагментами ДНК и агрономическими признаками фасоли пока обнаружить не удалось.

Полипептидный и углеводный состав антипитательных веществ фасоли. Исследован полипептидный состав ингибиторов гидролаз и лектинов семян фасоли сорта Оран. Полипептидные фракции ингибиторов протеиназ распределены равномерно по всей длине электрофорограммы и разделяются на 14 компонентов (рис. 7,1). Для ингибиторов α -амилазы фасоли характерно преобладание полипептидных фракций, которые по молекулярной массе соответствуют 25...45КДа, и разделяются на 18 компонентов (рис. 7,2). Полиморфизм сортов по данному признаку не изучался.

Лектины по полипептидному составу представляют собой гетерогенный белковый комплекс. Они разделяются на 11 компонентов с различной электрофоретической подвижностью. Доминируют достаточно тяжелые компоненты белка (от 45 до 65 КДа, рис. 7,3).

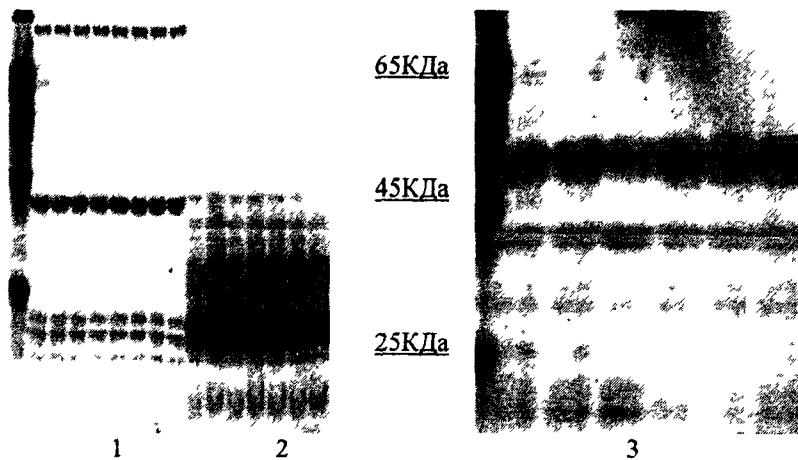


Рис. 7. Электрофореграммы ингибиторов 1-протеиназ, 2- α -амилаз, 3-лектинов фасоли сорта Оран

Хроматографическое исследование углеводного состава лектинов с использованием стандартных метчиков показало наличие у них мальтозы, глюкозамина, галактозы, арабинозы, фруктозы, глюкурона, рамнозы. От наличия тех или иных углеводов в составе лектинов зависят агглютинирующие свойства данных белков и их значение в растениях и биотехнологии, что является предметом наших дальнейших исследований.

Испытание белковых компонентов на биологическую активность. Как было установлено, активность лектинов фасоли различна по отношению к группам крови человека. Биологическая активность у образцов фасоли имеет разницу по разным группам крови ($\Gamma\Delta$ от 16 до 30 единиц). Контрастные значения выявлены у сорта Шоколадница (рис. 8), а также Оран и Нерусса, которые можно рекомендовать в качестве маркеров для определения групп крови и при разработке диетического питания. Так, для людей с 1-ой группой крови фасоль для питания наиболее предпочтительна, чем для лиц с 3-ей, 4-ой и особенно 2-ой группами.

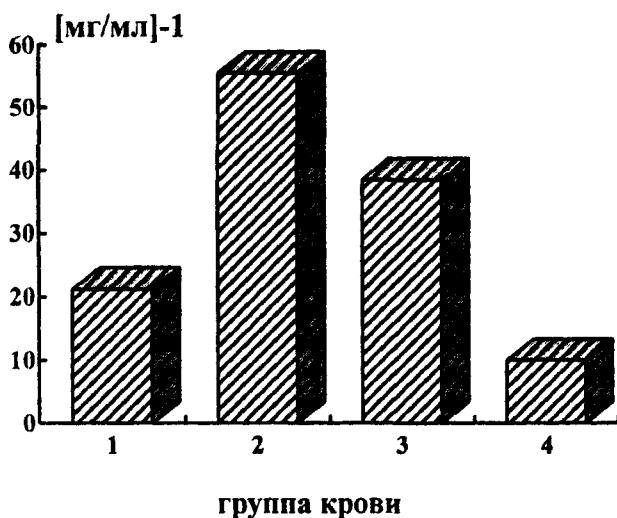


Рис 8. Гемагглютинирующая активность лектинов фасоли сорта Шоколадница

Биологическая активность препаратов, созданных на основе белков семян фасоли, испытана на горохе сорта Орпелла. Установлено, что Эпин и лектин фасоли в низкой концентрации усиливали ростовые процессы проростков и развитие корневой системы гороха. Обработанные лектином более высокой концентрацией и контрольные растения (вода) отставали в росте от других вариантов и в развитии корней и наземной части проростка.

Ранее было установлено (Павловская и др., 2002), что показателем устойчивости гороха к патогенам может служить альтернативная оксидазная система клеток: пероксидаза и каталаза, по активности которых можно судить о жизнеспособности растений. Пероксидаза и каталаза конкурируют за субстрат – перекись водорода и активность отдельно каждого фермента зависит от работы «партнера».

Нами отмечалось увеличение активности пероксидазы гороха при обработке семян раствором лектина фасоли с высокой степенью разведения (рис. 9).

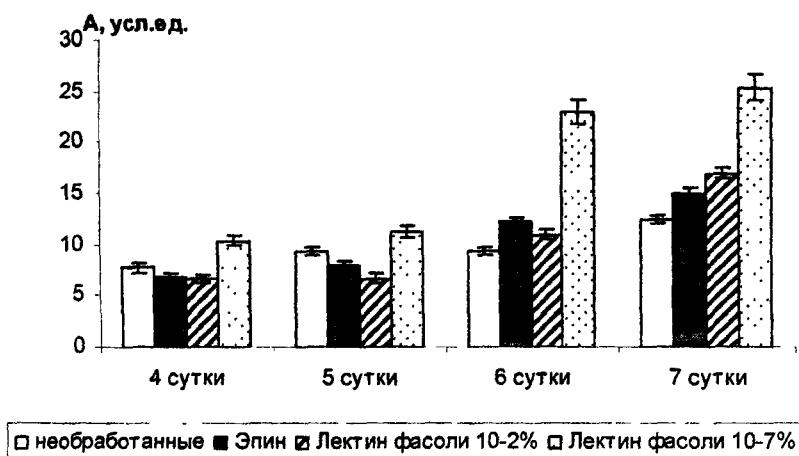


Рис. 9. Активность пероксидазы в проростках гороха

Катализная активность, напротив, по мере роста проростков существенно снижалась. При этом у контрольных растений это уменьшение происходило более резко и скачкообразно. Наиболее плавно и незначительно отмечалось уменьшение каталазной активности у проростков гороха, обработанных более высокой концентрацией лектина фасоли (рис. 10).

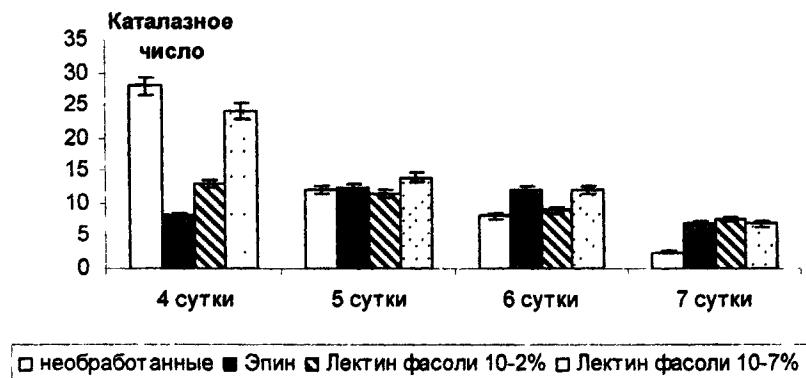
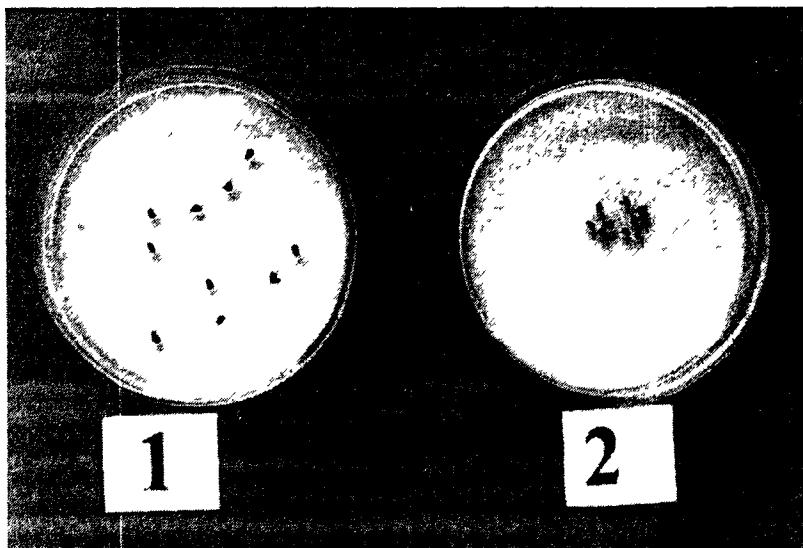
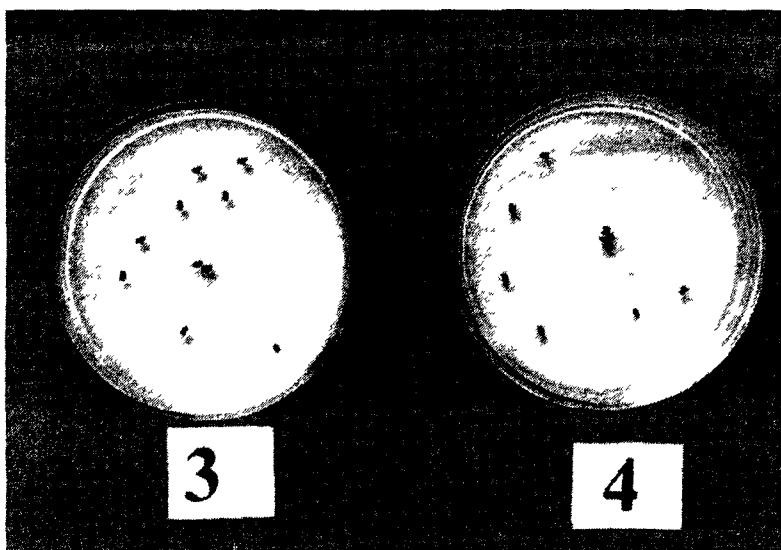


Рис. 10 Активность катализы в проростках гороха

Таким образом, лектины фасоли стимулировали ростовые процессы гороха и повышали ферментативную активность клеток, связанную с болезнеустойчивостью (рис. 11).





3- ингибиторы а – амилаз, 4-ингибиторы протеиназ

Рис. 11. Результаты испытания ингибиторов протеиназ и а –амилаз на инсектицидную активность

Испытание препаратов на гороховой зерновке показало их мягкое инсектицидное воздействие. При обработке жуков растворами лектинов в исходной концентрации их гибель наступает в 30% случаев, при обработке лектинами с меньшей концентрацией снижается. Обработка жуков гороховой зерновки вытяжкой ингибиторов протеиназ в исходной концентрации приводит к 60 %гибели жуков. Более низкие концентрации менее эффективны

Изучение влияния препаратов на повышение болезнеустойчивости гороха к возбудителю корневых гнилей *Fusarium oxysporum* по активности пероксидазы проростков гороха показало их положительное воздействие. Так, замачивание семян гороха в растворах ингибиторов фасоли приводит к повышению активности пероксидазы в здоровых и зараженных спорами гриба *Fusarium oxysporum* растениях. Через 7 дней отмечено явное преимущество вариантов с ингибиторами, где активность пероксидазы возрастает в 1,5...1,8 раз.

В 2003 году в полевых условиях проводилось изучение биопестицидных свойств препаратов, приготовленных на основе ингибиторов протеиназ фасоли, на сортах гороха Орпелла и Спрут. Семена замачи-

вали в комплексных препаратах в различных концентрациях, контроль: вода и промышленный препарат БИ – 58 (новый).

Установлено, что ингибиторы протеиназ повышают устойчивость гороха к бледнопятнистому аскохитозу на 16 %, снижают поражение семян гороховой плодожоркой на 12%, увеличивают урожай семян на 20 %.

В 2004-2005 годах на сорте гороха Норд в полевых условиях проводились испытания комплексных препаратов, созданных на основе лектинов фасоли.

Обработка семян гороха сорта Норд препаратами повышает устойчивость растений гороха к аскохитозу на 16 %, снижает развитие корневых гнилей на 10 %, повышает урожайность на 16...23 %.

Таким образом, компоненты белкового комплекса семян фасоли проявляют биологическую активность, повышают иммунитет растений гороха к возбудителям болезней и вредителям, оказывают стимулирующее действие на накопление урожая семян. Отсюда, фасоль может быть не только продуктом для питания, но и сырьем для получения биологически активных компонентов, диагностикумов и экологически чистых, безопасных для здоровья животных и человека биопестицидов мягкого действия, не уничтожающих, как химические препараты, все живое, а регулирующих численность биоты.

ВЫВОДЫ

- Проведен скрининг 24 образцов фасоли на содержание суммарных запасных белков и антипитательных веществ семян. Содержание белка по сортам колеблется от 22,1 до 29,9%. Активность ТИА - от 6,58 до 11,39 мг/г, ХИА - от 3,75 до 7,02 мг/г, ГА лектинов от 17,03 до 58,8 [мг/мл]⁻¹, цианогенных гликозидов - от 0,5 до 3,33 мг/100г. Наибольшее содержание белка отмечено у сортов: Оран, Шоколадница, Л 179, К 15077, К 15196, а антипитательных компонентов - у сортов: Оран, Ока, Шоколадница. Содержание цианогенных гликозидов в изученных образцах фасоли находится в пределах ПДК (0,5...0,33 мг/100г).

- Установлен полипептидный состав суммарных запасных белков семян фасоли, состоящий из 25...30 компонентов, и зависящий от генотипа. Белки семян линий состоят из одного биотипа, а сорта и коллекционные образцы из двух – трех. Определяющим по всем образцам является первый биотип, на долю которого приходится наибольший процент встречаемости. Составлены белковые паспорта 15

сортов фасоли, которые могут быть включены в компьютерную базу данных по биологическому разнообразию флоры и фауны планеты.

3. Ранние фазы формирования семян всех образцов фасоли отличаются единообразием ЭФ-спектров белков, что указывает на эволюционное единство происхождения. В поздние сроки созревания проявляется сортоспецифичность и дивергенция признака, что делает возможным идентификацию генотипов фасоли по полипептидному составу семян.

4. Праймером Ваге выявлены ДНК-маркеры фасоли, соответствующие 150-700 п.н., связанные с индивидуальными признаками образцов.

5. Разработаны методы выделения и очистки ингибиторов и лектинов применительно к фасоли. Выход ингибиторов протеиназ составил 18 мг/100г, амилаз – 14 мг/100г лектинов -32 мг/100г.

6. Методом электрофореза установлено, что ингибиторы протеиназ состоят их 14, амилаз – 18, лектины из 11 полипептидов. Хроматографическое разделение углеводов лектинов выявило наличие в их составе: мальтозы, глюкозамина, галактозы, арабинозы, фруктозы, глюкурона и рамнозы.

7. Испытания лектинов на биологическую активность показало, что гемагглютинирующая активность по второй группе крови самая высокая ($33,03\dots58,8 \text{ [мг/мл}^{-1}]$), по третьей ($21,21\dots38,00 \text{ [мг/мл}^{-1}]$), по четвертой ($21,22\dots32,79 \text{ [мг/мл}^{-1}]$), а по первой самая низкая ($17,04\dots27,62 \text{ [мг/мл}^{-1}]$). Сорт фасоли Шоколадница можно использовать в качестве диагностикума для выявления групп крови и при разработке диетического питания.

8. Лектины и ингибиторы гидролаз фасоли повышают пероксидазную активность, устойчивость растений к патогенам и фитофагам, увеличивают урожайность гороха (на 8...23%).

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Рекомендуется проводить идентификацию коллекционных, селекционных образцов и районированных сортов фасоли по белковому «паспорту» методом электрофореза для определения сортовой чистоты, семенного контроля, установления авторства и решения арбитражных споров.

2. Сорта фасоли Оран, Ока, Шоколадница, Нерусса рекомендуется использовать в качестве сырья для получения ингибиторов гидро-

лаз и лектинов, необходимых для производства медицинских диагностикумов, лекарственных препаратов и биопестицидов.

3. Разработанные методы выделения лектинов и ингибиторов гидролаз фасоли можно рекомендовать специалистам, работающим в биотехнологической отрасли (медицинской и сельскохозяйственной).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Гагарина, И.Н. ПЦР-анализ для идентификации генотипов фасоли /И.Н. Гагарина, О.А Шалимова, Н.Е. Павловская //1-й Международный конгресс «Биотехнология – состояние и перспективы развития» : матер. конгресса (14-18 окт. 2002г., Москва). –М., 2002. -С.111-112.
2. Яроватая, М.А. Лектины зернобобовых культур в биотехнологии / М.А. Яроватая, И.Н Гагарина, М.П. Мирошникова, Н.Е. Павловская // Материалы 68-й межвузовской научной практической конференции студентов и молодых уч.– Курск, 2003.- С. 27-28.
3. Паракин, Н.В. Биотехнологические подходы к решению вопросов переработки растительного сырья зернобобовых и крупяных культур /Н.В. Паракин, Н.Е.Павловская, И.В.Горькова, И.Н.Гагарина //2 Международный конгресс «Биотехнология – состояние и перспективы развития» : матер. конгресса (окт. 2003г., Москва) –М.-С.218 - 219.
4. Яроватая, М.А. Роль компонентов белкового комплекса зернобобовых культур в лечении злокачественных заболеваний / М.А. Яроватая, И.Н Гагарина, М.П Мирошникова, Н.Е.Павловская //Хирургические науки в России: история, современность и перспективы, к 120 - летию научной деятельности П.И. Дьяконова : материалы науч. конф.– Орел, 2003. –С.42-43.
5. Т. 5 ,ч.2: Вклад земляков – орловцев в становление российской науки, культуры и образования.-2003.-С.62-63.
5. Гагарина, И.Н. Создание и использование экологически чистых иммуномодуляторов при возделывании гороха / И.Н. Гагарина, К.Ю Зубарева, Н.Е.Павловская //Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря: материалы 4 Всеросс. конф.– Астрахань, 2003.- С.64-66.
6. Гагарина, И.Н. Биотехнологическая переработка семян фасоли для получения физиологически активных веществ / И.Н. Гагарина, Н.Е. Павловская //Второй съезд общества биотехнологов России : материалы второго съезда общества биотехнологов России (13-15 окт. 2004г., Москва).-М.,2004. -С.59-60.

7. Гагарина, И.Н. Лектины фасоли как маркеры групп крови / И.Н.Гагарина, Н.Е Павловская, М.П.Мирошникова //Физиологические аспекты продуктивности растений : материалы науч. –метод. конф. [В 2 ч.]), - Орел, 2004. - Ч. 1.– С.254-256.
8. Гагарина, И.Н. Лектины как компоненты, составляющие белковый комплекс фасоли / И.Н. Гагарина, Н.Е. Павловская //Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов :международный сб. науч. работ.-Воронеж : ВГУ ,2004.-Вып.6.– С. 51-54.
9. Гагарина, И.Н. Выделение лектинов и ингибиторов трипсина и химотрипсина из семян фасоли для создания природных фитоиммуномодуляторов //Биологические основы современной агрономии : матер. науч.-практ. конф.молодых уч. и аспир. фак. агробизнеса и экологии. – Орел, 2004. –С.7-10.
10. Гагарина, И.Н. Влияние обработки лектиносодержащими и ингибиторосодержащими препаратами на жизненную активность взрослых особей *Bruchus pisorum* L. ВГУ / И.Н. Гагарина, К.Ю. Зубарева //Биологические основы современной агрономии: матер. науч.-практи. конф. молодых уч. и аспир. фак. агробизнеса и экологии. – Орел, 2004. –С.19-21.
11. Шалимова, О.А. Иммунокоррекция устойчивости растений гороха и пшеницы с помощью лектинов растительного происхождения/ О.А. Шалимова, И.Н.Гагарина, Е.Г. Прудникова //Пути повышения устойчивости сельскохозяйственного производства в современных условиях: матер. Всеросс. науч.-практ. конф. – Орел, 2005. –С.296-303.
12. Гагарина, И.Н. Перспективы использования биологического сырья для получения фитоиммуномодуляторов /И.Н. Гагарина, Н.Е. Павловская //Пути повышения устойчивости сельскохозяйственного производства в современных условиях: матер. Всеросс. науч.-практ. конф. – Орел, 2005. – С.303-309.
13. Гагарина, И.Н. Биотехнологический подход к использованию лектиносодержащих препаратов / И.Н.Гагарина , Е.Г. Прудникова, Н.Е. Павловская //Третий съезд общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова : матер.третьего съезда общества биотехнологов России (25-27 окт. 2005г., Москва).- М.,2005. - С.102.
14. Шалимова, О.А. Индуцирование устойчивости у гороха и пшеницы лектиносодержащими препаратами / О.А. Шалимова, И.Н. Гагарина, Е.Г. Прудникова, Н.Е. Павловская //Третий съезд общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова: матер.третьего съезда общества биотехнологов России (25-27 окт. 2005г., Москва).- М.,2005.- С.130-131.

15. Гагарина, И.Н. Использование белковых маркеров в сортовой идентификации бобовых / И.Н. Гагарина , Н.А. Корниенко //Научные основы повышения эффективности сельскохозяйственного производства : матер. науч.- практ. конф. молодых уч. и аспир. фак. агробизнеса и экологии. – Орел, 2005. - С. 113-117.
16. Гагарина, И.Н. Прудникова Е.Г. Сравнительный анализ полипептидного состава токсичных веществ зерновых и бобовых культур / И.Н. Гагарина, Е.Г. Прудникова //Научные основы повышения эффективности сельскохозяйственного производства : матер. науч. – практ. конф. молодых уч. и аспир. фак. агробизнеса и экологии. – Орел, 2005. – С. 120-128
17. Прудникова, Е.Г. Идентификация сортов и линий зерновых и бобовых культур по электрофоретическим спектрам запасных белков / Е.Г. Прудникова, К.Ю Зубарева, И.Н.Гагарина //Вклад молодых ученых в решение проблем аграрной науки : матер.межрегиональной науч.-практ. конф. молодых уч.– Воронеж, 2005. – С. 107-109.
18. Лабораторный практикум по биохимии растений : уч.пособ. для студ.спец.: Агрономия 310200. Агроэкология 320400 /[Н.Е Павловская, В.П. Наумкин, И.В Горькова, И.Н Гагарина, А. И. Гринблат.]- Орел, 2005. - 136с.
19. Шалимова, О.А. Иммунокоррекция устойчивости растений гороха и пшеницы с помощью лектинов растительного происхождения / О.А.Шалимова, И.Н Гагарина, Е.Г. Прудникова, Н.Е. Павловская //Агрохимия.- 2005.- №12.[В печати]
- 20.Гагарина, И.Н. Новый биоинсектицид на основе ингибиторов гидролаз / И.Н Гагарина, Е.Г. Прудникова, Н.Е. Павловская //Регуляция продукции процесса сельскохозяйственных растений : матер. конф. Орловского регионального отделения общества физиологов растений РФ. – Орел, 2005. [В печати].

Выражаю искреннюю благодарность старшему научному сотруднику ГНУ ГНИИЗБК кандидату сельскохозяйственных наук М.П. Мирошниковой за предоставленные для исследований образцы фасоли и заведующей лабораторией защиты и фитоиммунитета растений, кандидату сельскохозяйственных наук Г.А. Борзенковой за проведенные испытания препаратов на горохе.

РНБ Русский фонд

2007-4
5667

Издательство ОрелГАУ, 2005, Орел, Бульвар Победы, 19.

Заказ 12/1. Тираж 100 экз.

