

27. Jordan M.J., Lechavalier M.P. Effect of zinc smelter emissions on forest soil microflora// Can. J. Microbiol. 1975. V. 21. № 11. P. 1855-1865.
28. Strojan C.L. Forest leaf litter decomposition in the vicinity of a zinc smelter// Oecologia (Berl). 1978. V. 32. № 2. P. 203-212.
29. Swift M.J., Heal O.W., Anderson J.M. Decomposition in terrestrial ecosystem. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979. – 372 p.
30. Tyier G. The impact of heavy metal pollution on forests: a case study of Gusum, Sweden// Ambio. 1984. V. 13. № 1. P. 18-24.
31. Voron V.P. Aeral-technogenic soil transformation in the forest ecosystems of the Ukraine. In: Collection of papers by Ukrainian members European Society for soil conservation. – 1997/3. – P. 45-54.

УДК 577.112

Доц. Р.Т. Гут, канд. біол. наук;
мол. наук. співроб. В.А. Ковальова – УкрДІТУ

ДЕФЕНЗИНИ ЯК ФАКТОР РЕЗИСТЕНТНОСТІ РОСЛИН ДО БІОТИЧНОГО СТРЕСУ

Біотичний стрес викликає інтенсивне нагромадження в інфікованих тканинах патогеніндукованих білків, одними з яких є дефензини. У цій роботі подано характеристику будови, біологічної активності, молекулярних механізмів дії та перспективи використання рослинних дефензинів.

Doc. R.T. Gout; researcher V.A. Kovalyova – USUFWT

Defensins as the factor of a resistance of plants to a biotic stress

The biotic stress causes intensive accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins in the infected tissues. Defensins is one of groups of PR proteins that have antifungal and antimicrobial activities. In this review the characteristic of a structure, biological activity, molecular mechanisms of action and the future trends of use of the plant defensins is described.

Вступ

Протягом усього свого еволюційного розвитку живі організми захищали себе від різноманітних патогенів. Внаслідок цього виникли сигнальні механізми для реалізації реакцій відповіді на біотичний стрес і пройшов відбір найбільш ефективних засобів захисту. Інфікування патогенними організмами рослини включає різні сигнальні системи, які сприймають, примножують та передають сигнали з поверхні рослинної клітини, де відбувається розпізнавання патогена, до генетичного апарату клітини, де активується експресія захисних генів. Це дає змогу рослинному організму організувати як структурний, так і хімічний захист від діючого чинника. При вивченні особливостей впливу патогенів було виявлено інтенсивне нагромадження в інфікованих тканинах так званих патогеніндукованих білків (PR) [1]. Ці захисні білки поділяються на декілька груп залежно від біологічної активності та структурної гомології. Представники першої групи є учасниками сигнальних мереж, задіяних в передачу сигналу в ядро клітини, другої – обмежують живлення патогенів. Третя група патогеніндукованих білків каталізує утворення низькомолекулярних рослинних антибіотиків – фенілпропаноїдних або терпеноїдних фітоалексинів. Представники четвертої групи каталізують реакцію

зміцнення клітинних стінок рослин, п'ятої – викликають апоптоз інфікованих і сусідніх з ними клітин. І, нарешті, шоста група білків може діяти безпосередньо на патогенні організми, зупиняючи або уповільнюючи їх ріст. До цієї групи належать багаті на цистеїн поліпептиди з молекулярною масою від 2 до 9 кДа, яким властива протигрибкова активність – дефензини.

Будова дефензинів

Рослинні дефензини – це група невеликих основних білків з високим вмістом цистеїну, які зупиняють ріст фітопатогенних грибів, ооміцетів та грампозитивних бактерій *in vitro* [2]. Перші рослинні дефензини були ізольовані з зерен пшениці (*Triticum aestivum*) [3] та ячменю (*Hordeum vulgare*) [4] і спочатку були класифіковані як підгрупа родини тіонеїнів (низькомолекулярних цистеїнівмішуючих білків) та названі γ -тіонеїнами. Наступна ідентифікація інших γ -тіонеїноподібних білків з різних родин рослин та вивчення їхньої структури показали істотні відмінності між γ -тіонеїнами та класичними тіонеїнами [2, 5]. Пізніше ці білки були названі "рослинними дефензинами" за їх структурною та функціональною подібністю до дефензинів ссавців та комах [5]. Всі вони мають ідентичний план будови – одну довгу α -спіраль, β -шар з трьох антипаралельних ланцюгів та чотири дисульфідні містки. Для молекули дефензина характерний $CS\alpha\beta$ -мотив – це структура, яка формується, коли два залишки цистеїна, які знаходяться в одному завитку α -спіралі утворюють два дисульфідні містки з двома залишками цистеїна, розділеними одною амінокислотою, в останньому ланцюзі β -шару (рис. 1). Така структура присутня і в нейротоксині скорпіона.

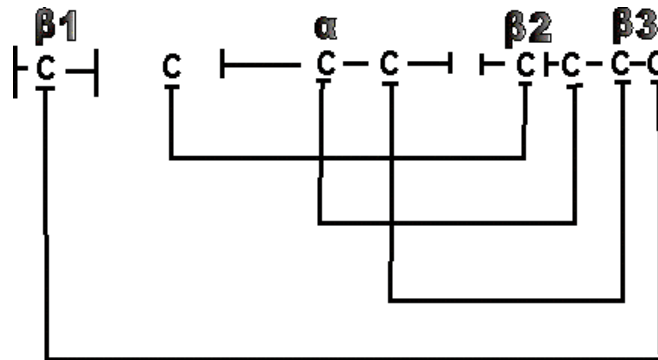


Рис. 1. Схема загальної будови рослинних дефензинів: C – цистеїн; α – α -спіраль; β_1 , β_2 , β_3 – β -структури (лініями показані дисульфідні містки)

Зараз описано вже понад 80 дефензинподібних білків із 38 видів рослин, вони мають відмінний амінокислотний склад, і тільки положення восьми цистеїнових залишків, які стабілізують структуру молекули, є консервативним. Ця варіабільність відображається і в різній біологічній активності, яка властива рослинним дефензинам.

Класифікація дефензинів рослин

На цей час рослинні дефензини розподіляють на чотири групи залежно від біологічної активності та структурної гомології [2]. Представники першої групи інгібують ріст широкого кола фітопатогенних грибів, вони зупиняють елонгацію гіфів та посилюють їх галуження – це так звана морфогенна група. До цієї групи належать рослинні дефензини з *Raphanus sativus* [6], *Ara-*

bidopsis thaliana, *Brassica napus* [7]. Дефензини з рослин родин Asteraceae, Fabaceae і Hippocastanaceae, призупиняючи ріст гіфів грибів, не викликають морфологічних змін останніх і належать до другої (неморфогенної) групи [7]. Дефензини з перших двох груп або зовсім не мають антимікробної активності, або вона виражена дуже слабо. Рослинні дефензини з третьої групи активні проти бактерій, інгібують α -амілази та протеази *in vitro* та синтез білків у безклітинних системах [2, 3], але не виявляють фунгіцидних властивостей. До цієї групи належать патогеніндуковані білки з *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor* та *Solanum tuberosum*. Дефензини четвертої групи були виділені з *Spinacia oleracea* і виявилися унікальними як за своєю структурою, так і за властивостями. У дуже маленькій концентрації (менше 20 мкМ) вони були активні проти грампозитивних (*Clavibacter michiganensis*) та грамнегативних (*Ralstonia solanacearum*) бактеріальних патогенів, а також проти грибів *Fusarium culmorum*, *F. solani*, *Bipolaris maydis* та *Colletotrichum lagenarium* [8]. Морфологічних змін гіфів грибів не викликали.

Експерименти по сайт-специфічному мутагенезу показали, що біологічна активність кожної групи пов'язана з невеличкою консервативною послідовністю, яка властива тільки цій групі, або навіть з однією амінокислотою в певному положенні. Так, для дефензинів з першої групи – це тирозин у положенні 38, а для дефензинів з четвертої групи – це послідовність з п'яти амінокислотних залишків на N – кінцевій ділянці молекули.

Найбільша кількість дефензинів була виділена з насіння [2], також ці білки синтезуються в листях [5, 8], стручках квасолі [9], бульбах картоплі [10], фруктах [11], тканинах генеративних органів рослин [10]. Утворення дефензинів у рослин індукується не тільки патогенами, але й проміжними продуктами сигнальних систем клітини і деякими стресовими фітогормонами – метилжасмонатом та етиленом, хоча регуляція цими сполуками експресії генів різних дефензинів може сильно відрізнятись [12].

Дефензини хвойних рослин

Нещодавно з коренів сіянців норвезької ялини *Picea abies* (L.) Karst., інфікованих *Pythium dimorphum* [13] був виділений дефензинподібний білок SPI1 (spruce pathogen induced 1) з молекулярною масою 5 кДа. Амінокислотна послідовність цього білка мала 40-60 % гомології з рослинними дефензинами інших видів (табл. 1). Надекспресія (збільшення концентрації білка в клітині шляхом використання генно-інженерних конструкцій) SPI1 підвищувала резистентність господаря як в гомологічних, так і в гетерологічних системах. Так, надекспресія SPI1 в ембріональних клітинах *Picea abies* сприяла виникненню резистентності цих клітин до інвазії патогенним грибом *Heterobasidion annosum* [13], а збільшення концентрації цього білка у рослини *Nicotiana tabacum* обмежувала ріст патогенної бактерії *Erwinia carotovora* [14].

Рослинні дефензини були ізольовані з насіння рослин родин Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Brassicaceae (табл. 1) і було показано, що ці патогеніндуковані поліпептиди становлять коло 0,5 % від загального вмісту білків у насінні [7]. Однак білок SPI1 не був виявлений у насінні норвезької ялини, яке знаходилося в стані спокою, і тільки при проростанні насіння починалася

експресія цього пептида в корінцях здорових проростків. При інфікуванні сіячів *Picea abies* грибом *H. annosum*, який уражає кореневу систему, вже через 12 годин спостерігалось істотне підвищення рівня *SPII* в коренях, але протягом наступних двох діб рівень різко зменшувався, що дало змогу говорити про можливу супресію з боку патогена біосинтезу дефензину [15]. Цей факт є ще одним підтвердженням гіпотези генної взаємодії між патогеном і господарем.

Табл. 1. Деякі види рослин, з яких виділені дефензини, гомологічні до *SPII* з *Picea abies* (L.) Karst

Родина	Вид	Органи рослини	Гомологія %
Pinophyta			
Pinaceae	<i>Picea abies</i> (Ялина звичайна)	Корінь, листя	100
	<i>Picea glauca</i> (Ялина канадська)	Корінь	97
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i> (Гінкго дволопатеве)	Корінь	77
Magnoliophyta			
Liliopsida			
Poaceae	<i>Oryza sativa</i> (Рис посівний)	Насіння	50
	<i>Triticum aestivum</i> (Пшениця м'яка)	Насіння	49
	<i>Zea mays</i> (Кукурудза)	Насіння	46
	<i>Sorghum bicolor</i> (Сорго звичайне)	Насіння	42
Areaceae	<i>Elaeis guinensis</i> (Олійна пальма)	Квітка	41
Magnoliopsida			
Musaceae	<i>Musa acuminata</i> (Банан)	Квітка	52
Rosaceae	<i>Persica vulgaris</i> (Персик звичайний)	Плід	47
	<i>Pyrus pyrifolia</i> (Груша китайська)	Квітка	43
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i> (Перець однорічний)	Листя, плід	47
	<i>Solanum tuberosum</i> (Картопля)	Бульби	43
	<i>Lipopersicon aesculentum</i> (Помідор їстівний)	Квітка	43
	<i>Nicotiana tabacum</i> (Тютюн справжній)	Квітка	41
	<i>Petunia inflata</i> (Петунія здута)	Квітка	40
Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Різушка Таля)	Корінь, квітка	56
	<i>Raphanus sativus</i> (Редька посівна)	Насіння, листя	42
	<i>Brassica oleracea</i> (Капуста городня)	Проросток	42
	<i>Sinapsis alba</i> (Гірчиця біла)	Насіння	42
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i> (Каштан посівний)	Насіння	43
Rutaceae	<i>Citrus x paradise</i> (Грейпфрут)	Плід	42
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i> (Соняшник однорічний)	Квітка	42
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i> (Буряк звичайний)	Листя, квітка	41
Fabaceae	<i>Glycine max</i> (Соя культурна)	Листя, насіння	43
	<i>Vigna radiata</i> (Маш)	Насіння	40
	<i>Phaseolus coccineus</i> (Квасоля вогняно-червона)	Насіння	37
	<i>Pisum sativum</i> (Горох посівний)	Насіння, листя, корінь, стебло	37

За допомогою методів імуногістохімії було показано, що SPI1 експресується в кортикальних та ендодермальних клітинах у процесі росту та елонгації коренів [15]. Цікаво, що саме ендодерм та кора є найбільш резистентними ділянками кореня сосни до інвазії патогену *H. annosum*. Рослинні дефензини були описані як екстрацелюлярні білки, які конститутивно експресуються в поверхневих шарах клітин насіння, вегетативних та генеративних органів і виконують роль першої лінії захисту найбільш уразливих тканин [2]. Припускають, що і дефензин SPI1 відіграє подібну роль у захисті від проникнення гіфів гриба через кору кореня до транспортних шляхів рослини, а локалізація його на межі клітинна оболонка – плазматична мембрана свідчить про секрецію білка з клітини [15].

Дефензини можуть експресуватись тканиноспецифічно і аналіз геному рослини *Arabidopsis* [16] показав існування мультигенної родини рослинних дефензинів у покритонасінних. Нещодавно була виділена SPII подібна кодуєча ДНК (SPIIB) з хвої *Picea abies* (L.) Karst., первинна структура дефензина SPIIB відрізнялась за трьома амінокислотними залишками від SPI1. Можливо, що в результаті дослідження геному норвезької ялини та інших хвойних рослин також будуть виявлені мультигенні родини дефензинів у голонасінних.

Молекулярні механізми дії рослинних дефензинів

При вивченні причин інгібуючого впливу дефензинів на патогенні гриби було виявлено, що ці сполуки мають здатність викликати зміну мембранного потенціалу клітинної мембрани гриба, підсилювати поглинання Ca^{2+} та вихід K^{+} з клітини, інгібувати Na^{+} -канали [17]. Показано, що рослинні дефензини взаємодіють зі специфічними ліпідними компонентами плазматичної мембрани грибів. Так, дефензин RsAFP2 з *Raphanus sativus* зв'язується з глікозилцерамідами, а дефензин DmAMP1 з *Dihlia merskii* взаємодіє безпосередньо з сфінголіпідами в присутності еквімолярної кількості ергостерола. Сфінголіпіди та стероли є одними з компонентів мембранних мікродоменів – рафтів. Саме шляхом взаємодії дефензинів з рафтами створюються локальні високі концентрації цих мембранозв'язаних білків [18]. І хоча мішені на мембрані грибів для різних рослинних дефензинів можуть відрізнятися, але результатом взаємодії є зміна проникності мембран зі згаданими вище наслідками. Можливо, що саме відмінностями в структурі мембранних ліпідів клітин рослин і грибів пояснюється селективна активність дефензинів проти патогенних грибів та відсутність токсичного впливу на самі рослини.

Якщо механізми взаємодії патогеніндукованих пептидів з мембраною грибів стали більш зрозумілими, то питання про внутріклітинні мішені для дефензинів залишається відкритим. І в цьому ракурсі дуже цікавим є факт визначення дефензина методом мас-спектрометрії серед пептидів з екстрактів проростків сосни звичайної, які зв'язались з сорбентом з імобілізованим фосфотирозином (наші неопубліковані дані). Відомо, що рослинні дефензини – катіонні білки, і можливо, вони взаємодіють з негативно зарядженою фосфорною групою, але, й можливо, що ця взаємодія більш специфічна, подібна до зв'язування SH2 доменів з фосфотирозином. Отримання дефензину з *Pinus silvestris* дало б змогу дослідити властивості цього білка та можливі перспективи використання.

Висновок

Важливим напрямком створення резистентних до патогенів рослин є перенос в їхні клітини генів природних білків (дефензинів, тіонеїнів), які порушують функціонування клітинних мембран патогенних грибів та бактерій. Ці гени можуть бути отримані як із самих рослин, так і з тварин, комах та бактерій, оскільки дефензини мають достатньо консервативні ділянки молекул. Прикладом можуть бути трансгенні рослини томатів, які мають підвищену стійкість до патогенів, що було забезпечено переносом гена дефензину кроля [9].

Дослідження впливу рослинних дефензинів на культури клітин людини показали їх нетоксичність для цих клітин. Дефензинподібний білок з бобів (*Gymnocladus chinensis* Baill) виявив антипроліферативну активність на культури ракових клітин гепатоми HepG2 та лейкоемічних L1210 та M1 [20]. Деякі рослинні дефензини виявляли фунгіцидну активність проти патогенного для людини гриба *Candida albicans*. Всі ці факти дають змогу говорити про перспективи використання дефензинів рослин як фармакологічних препаратів.

Література

1. Neuman D, Nover L, Parthier B, Rieger R, Scharf RD, Wollgiehn R, Nieden U. Heat shock and other stress response systems of plants// Biol. Zentralbl. – 1989. Bd. 108. – S. 1-155.
2. Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Osborn RW. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system// Plant Physiol. – 1995. – 108. – P. 1353-1358.
3. Colilla FJ, Rocher A, Mendez E. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm// FEBS Lett. – 1990. – 270. – P. 191-194.
4. Mendez E, Moreno A, Collila F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Malinas M, DeHaro C. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm// Eur. J. Biochem. – 1990. – 194. – P. 533-539.
5. Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.). Their role in host defense// Plant Cell. – 1995. – 7. – P. 573-588.
6. Terras FRG, Schoofs HME, De Bolle MFC, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA., Broekaert WF. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds// J Biol Chem. – 1992. – 267. – P. 5301-5309.
7. Osborn RW, Desamblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, vanLeuven F, Attenborough S, Rees SB, Broekaert WF. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae// FEBS Lett. – 1995. – 368. – P. 257-262.
8. Segura A, Moreno M, Molina A, Garcia-Olmedo F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*)// FEBS Lett. – 1998. – 435. – P. 159-162.
9. Chiang CC, Hadwiger LA. The *Fusarium solani*-induced expression of a pea gene family encoding high cysteine content proteins// Mol Plant Microbe Interact. – 1991. – 4. – P. 324-331.
10. Moreno M, Segura A, Garcia-Olmedo F. Pseudothionin-ST1, a potato peptide active against potato pathogens// Eur. J. Biochem. – 1994. – 223. – P. 135-139.
11. Meyer B, Houlne G, Pozueta-Romero J, Schantz ML, Schantz R. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding// Plant Physiol. – 1996. – 112. – P. 615-22.
12. Devoto A, Turner JG. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*// Annals of Botany. – 2003. – 92. – P. 329-337.
13. Sharma P, Lönneborg A. Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce// Plant Mol. Biol. – 1996. – 3. – P. 707-712.
14. Elfstrand M, Fossdal CG, Swedjemark G, Clapham D, Olsson O, Sitbon F, Sharma P, Lönneborg A, von Arnold S. Identification of candidate genes for use in molecular breeding: a case study with the Norway spruce defensin-like gene, SPI1// Silvae Genet. – 2001. – 50. – P. 75-81.
15. Fossdal CG, Nagy NE, Sharma P, Lönneborg A. The putative gymnosperm plant defensin polypeptide (SPI1) accumulates after seed germination, is not readily released, and the SPI1 levels are reduced in *Pythium dimorphum*-infected spruce roots// Plant Mol. Biol. – 2003. – 52. – P. 291-302.

16. **Eppl P, Apel K, and Bohlmann H.** ESTs reveal a multi-gene family for plant defensins in *Arabidopsis thaliana*// FEBS Lett. – 1997. – 400. – P. 168-172.

17. **Thevissen K, Ghazi A, DeSamblanx GW, Brownlee C, Osborn RW, Broekaert WF.** Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins// J. Biol. Chem. – 1996. – 271. – P. 15018-15025.

18. **Thevissen K, Ferket KKA, Francois IEJA, Cammue BPA.** Interaction of antifungal plant defensins with fungal membrane components// Peptides. – 2003. – 24. – P. 705-712.

19. **Zhang XH, Guo DJ, Zhang LM, Li WB, Sun VR.** The research on the expression of rabbit defensin (NP-1) gene in transgenic tomato// Yi. Chuan. Xue. Bao. – 2000. – 27. – P. 953-958.

20. **Wong JH, Ng TB.** Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill)// Peptides. – 2003. – 24. – P. 963-968.

УДК 630*89

*Асист. А.Я. Андрусів – УкрДЛТУ; Г.В. Стрямець,
канд. с.-г. наук – Природний заповідник "Розточчя"*

РЕСУРСНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЛІСОВИХ МЕДОНОСІВ У БОРОВИХ ТА СУБОРОВИХ УМОВАХ РОЗТОЧЧЯ

Подано оцінку ресурсного потенціалу лісових медоносів у борових та суборових умовах Розточчя. З'ясовано, що найвищих показників – 150 кг/га сягає у період цвітіння *Vaccinium myrtillus* L., *Calluna vulgaris* (L) Hull.

Assist. A.Y. Andrusiv – USUFWT; G.V. Stryamets – Rezervat "Roztochchya"

The resource potential of forestry honey ginnings in gritty soils conditions of Roztochchya

An estimate of forestry honey ginnings resource potential in Roztochchya gritty soils conditions has been done. The highest data (150 kg/ha) are reached during *Vaccinium myrtillus* L., *Calluna vulgaris* (L) Hull. flowering.

Одним з найважливіших завдань лісового господарства в сучасних умовах є комплексне використання багатств лісу. Недеревні ресурси лісу (технічна та лікарська сировина, кормові, харчові та інші продукти) відіграють важливу роль у життєдіяльності людини. Особливо цінними є продукти лісового бджільництва: мед, пилок, прополіс, маточне молоко та бджолина отрута. У зарубіжній та вітчизняній літературі є чимало відомостей про нектаропродуктивність окремих видів рослин, рослинних угруповань, (А.М. Ковальов, А.С. Нуждін, В.І. Полтєв та ін. (1970), А. Малаю (1979), В.П. Рябчук (1956), В.П. Поліщук (1989), В.П. Поліщук, В.А. Гайдар, М.І. Черчик та ін. (1990), А.І. Черкасова, І.К. Давиденко, П.А. Губа та ін. (1991)), проте ресурсний потенціал лісових медодаїв у різних лісорослинних умовах вивчений ще недостатньо. Медопродуктивність хвойних насаджень Чернівецької області вивчав С. Павлик (1983), відомостей про інші райони Західної України в літературі ми не знайшли. Польові дослідження проводилися на території природного заповідника "Розточчя", Страдцівського НВЛК протягом 2000-2003 рр. Цукропродуктивність рослин визначали, користуючись методом змивання нектару водою. Хімічний аналіз на вміст цукру в нектарі проводили за методикою П. Іванова.

Бори займають незначну частину рівнинної Львівщини: на Розточчі – 0,3 %, у Малому Поліссі – трохи більше 3 % лісового фонду, на Опіллі – відсутні [1]. У борах зростають чисті соснові насадження або з невеликою до-