

НОВИЙ МЕТОД ВИДІЛЕННЯ БІЛКА З ПРОТИГРИБКОВОЮ АКТИВНІСТЮ З ПРОРОСТКІВ НАСІННЯ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

Запропоновано швидкий та ефективний метод виділення рослинних дефензинів, який дає змогу ізолювати з проростків сосни звичайної білок з молекулярною масою близько 10 кДа з антифунгальною активністю проти фітопатогенних грибів *Fusarium oxysporum* та *Pythium debaryanum*.

Ключові слова: дефензин, сосна звичайна, фосфоцелюлоза, виділення.

Researcher V.A. Kovalyova; doc. R.T. Gout – NUFWT of Ukraine

A new method of isolation of an antifungal protein from seedlings of Scots pine

The rapid and effective method of isolation of plant defensins is proposed. We have purified from seedlings of Scots pine 10 kDa protein with antifungal activity against plant pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Pythium debaryanum*.

Keywords: defensin, Scots pine, phosphocellulose, isolation.

Інфекційні хвороби лісових культур, що викликаються фітопатогенними грибами, завдають значних економічних збитків лісовому господарству. Важливе місце серед методів боротьби з лісовими інфекціями належить біологічним, як найбільш екологічно чистим. Дослідження молекулярних механізмів захисту рослин від патогенів є однією з передумов правильного визначення засобів боротьби з хворобами лісу.

У відповідь на інфікування рослини синтезують ряд білків, які отримали назву патогеніндукованих [1]. Одну з груп цих білків становлять дефензини – основні, низькомолекулярні, цистеїномісткі протеїни з протигрибковою активністю [2]. Описано вже понад 80 дефензиноподібних білків з 38 видів рослин, амінокислотний склад їх характеризується високою різноманітністю, консервативним є положення лише восьми цистеїнів та ще трьох амінокислот [3]. Дефензини були ізольовані з насіння [4], листя [5], бульби картоплі [6], фруктів [7] та тканин генеративних органів рослин [8].

Нещодавно гени, що кодують дефензини, були ідентифіковані і у генотипі деяких видів голонасінних *Picea glauca*, *Picea abies*, *Ginkgo biloba* [9]. Раніше ми показали, що дефензин експресується в проростках насіння сосни звичайної [10]. Оскільки цей білок ще не був ізольований з тканин хвойних рослин, то для дослідження його властивостей ми розробили метод виділення дефензину з коренів проростків сосни *Pinus sylvestris* L.

Матеріали і методи

Відсортоване життєздатне насіння сосни звичайної пророщували у чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою, у термостаті при температурі 26 °С. Корені з семиденних проростків видаляли та зберігали при температурі – 70 °С.

Рослинний матеріал (20 г) розтирали у ступці у рідкому азоті до порошкоподібного стану. Білки екстрагували 50 мМ сульфатною кислотою (3 мл/г сирової ваги) протягом 30 хв. при 4 °С. Нерозчинний матеріал видаляли фільтрацією через тканину та подальшим центрифугуванням (15000 об/хв.,

20 хв., 4 °C). До надосадової рідини додавали по краплях 10 мМ NaOH до рН 7,8 і витримували суспензію протягом 30 хв. при 4 °C. Осад видаляли після центрифугування при 15 000 об/хв., 20 хв. при 4 °C. Білки з надосадової рідини осаджували шляхом додавання твердого сульфату амонію спочатку до 35 % насичення, а потім до 80 %, осад формувався протягом 18 год при 4 °C і відокремлювався при центрифугуванні (15000 об/хв., 30 хв., 4 °C). Осад розчиняли у буфері, що містив 20 мМ трис-HCl, рН 7,4, 10 мМ NaCl, розчин прогрівали 10 хв. при 85 °C, центрифугували 14000 об/хв. протягом 20 хв. і 4 °C. Супернатант діалізували проти буферу, що містив 20 мМ трис-HCl, рН 7,4, 100 мМ NaCl, і наносили на колонку (об'ємом 3 мл) з фосфоцелюлозою P11 (Whatman, Великобританія), попередньо зрівноважену діалізним буфером. Сорбовані білки елюювали ступінчастим градієнтом концентрації NaCl: 0,3 М; 0,5 М та 1 М.

Білки отриманих фракцій аналізували електрофорезом у системі Лемлі [11]. З цією метою до аліквот фракцій (50 мкл) додавали ТХО до кінцевої концентрації 10 %, білки осаджували центрифугуванням та промивали холодним ацетоном, розчиняли у денатуруючому буфері (65 мМ трис-HCl, рН 6,8, 1 % SDS, 2 % 2-меркаптоетанол, 10 % гліцерин) та фракціонували електрофорезом у градієнті густини 5-22 % ПААГ за наявності 0,1 % SDS. Гель після електрофорезу фарбували сріблом.

Фракції, що містили білки з однаковою молекулярною масою, об'єднали, діалізували проти буфера, що містив 20 мМ трис-HCl, рН 7,4, 10 мМ NaCl, та зберігали при -70 °C до використання.

Результати та їх обговорення

На даний час існує декілька методичних підходів виділення дефензинів з рослинного матеріалу [8, 12, 13]. Запропоновані методи базуються на властивостях, характерних для цих білків: високий позитивний заряд молекули (+5...+7) та їх термостійкість. Враховуючи це, а також стабільність дефензинів при екстремальних значеннях рН, на перших етапах виділення ми використали модифіковану методику, яка була застосована для ізоляції тіонеїнів з ячменю [14], – екстракцію багатих на цистеїн білків сульфатною кислотою (рис. 1). Використання кислотної екстракції та наступне фракційне осадження білків різними концентраціями сульфату амонію дало змогу істотно збагатити фракцію дефензину та очистити її від основної маси білків (рис. 2, доріжки 1,3), що екстрагуються з проростків сосни звичайної.

Для подальшого очищення дефензину було використано іонообмінну хроматографію. У більшості методик як сорбент фігурують сильні катіоніти з сульфогрупою [12, 15]. Вибір нами фосфоцелюлози був зумовлений високою спорідненістю дефензину з *Pinus sylvestris* до сорбента, який містив фосфогрупу, що було показано нами у попередніх дослідженнях [16].

Електрофоретичний аналіз фракцій, елюйованих з фосфоцелюлози ступінчастим градієнтом концентрації хлориду натрію, показав, що білок, близький за молекулярною масою до дефензину, десорбувався з катіоніту розчином 0,5 М NaCl (рис. 2, доріжка 2).



Рис. 1. Схема виділення білка з протигрибковою активністю з семиденних проростків сосни звичайної

Виділений білок мав антифунгальну активність стосовно фітопатогенних грибів *Fusarium oxysporum* і *Pythium debaryanum*. Вихід чистого білка з протигрибковою активністю, отриманого за даною методикою, становить близько 400 мікрограм білка з 20 грамів рослинного матеріалу.

Запропонований нами методичний підхід дає змогу швидко та ефективно з використанням простих біохімічних процедур та іонообмінної хроматографії отримати електрофоретично гомогенний препарат білка, гомологічний рослинним дефензинам. Цей метод вигідно відрізняється від традиційних підходів до виділення рослинних дефензинів, які включають декілька видів хроматографій: гель-фільтрацію, іонообмінну та зворотнофазову вискоєфективну рідину на заключному етапі, потребують дорогого обладнання та тривалі за часом.

Таким чином, нами був вперше ізольований дефензин з представника класу голонасінних та показана його активність проти деяких видів фітопатогенних грибів. Метою наступних досліджень буде подальше вивчення біологічної активності виділеного білка, механізму протигрибкової активності, а також можливості використання дефензину як маркера для пошуку та відбору у природних популяціях генотипів з високим рівнем експресії дефензину, який зумовлює резистентність рослин до патогенів.

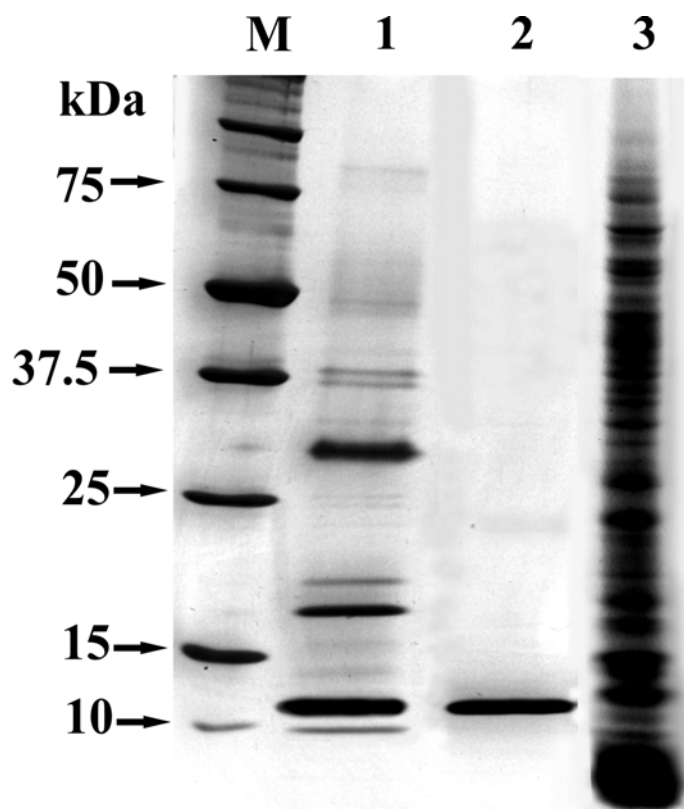


Рис. 2. Очистка дефензину з семиденних проростків сосни звичайної на фосфоцелюлозі. Білки фракціоновані 4-22 % ПААГ електрофорезом у присутності 0,1 % SDS. Гель зафарбований сріблом:
1 – сульфатамонійний осад білків; 2 – білки, елюйовані з фосфоцелюлози 0,5 М NaCl; 3 – загальний екстракт кислоторозчинних білків. Зліва вказано положення маркерів молекулярних мас

Література

1. Van Loon LC. Pathogenesis related proteins// Plant Mol.Biol. – 1985. – 4. – P. 111-116.
2. Menedez 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.
3. Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K. Plant defensins// Planta. – 2002. – 216. – P. 193-202.
4. 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.
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. Moreno M, Segura A, Garcia-Olmedo F. Pseudothionin-ST1, a potato peptide active against potato pathogens// Eur. J. Biochem. – 1994. – 223. – P. 135-139.
7. 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.
8. Lay FT, Bruglierra F, Anderson MA. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia// Plant Physiol. – 2003. – 131. – P. 1283-1293.
9. 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.
10. Гут РТ, Ковальова ВА. Дефензини як фактор резистентності рослин до біотичного стресу// Наук. вісник УкрДІТУ. – 2004, вип. 14.6. – С. 49-55.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4// Nature-1970. – 227. – P. 680-684.
12. Cammue BPA, De Bolle MFC, Terras FRG, Proost P, Damme JV, Rees SB, Vanderleyden J, Broekaert WF. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds// J. Biol.Chem. – 1992. – 267. – P. 2228-2233.
13. Wong JH, Ng TB. Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill)// Peptides. – 2003. – 24. – P. 963-968.

14. Ozaki Y, Wada K, Hase T, Matsubara H, Natanishi T, Yoshizumi H. Amino acid sequence of a purothionein analogue of barley flour// J. Biochem. – 1980. – 87. – P. 549-555.

15. Osborn RW, Desamblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekenes 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.

16. Kovalyova VA, Cramer R, Gout IT, Gout RT. The analysis of tyrosine phosphorylation in the process of seed germination of Scots pine// Укр. Біохім. Журн. – 2005. – 77, № 2. – С. 119-120.

УДК 591.5+630*13

Аспір. І.І. Делеган¹ – НЛТУ України

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ДЕРЕВ БУКА ЛІСОВОГО (FAGUS SILVATICA L.) РІЗНИХ ЕКОТИПІВ У ГЕОГРАФІЧНИХ КУЛЬТУРАХ НА РОЗТОЧЧІ

Подано загальну характеристику географічних культур бука лісового (*Fagus silvatica* L.) створених за Міжнародною програмою ІОФРО в 1995 р. Наведено результати дослідження збереженості дерев бука залежно від географічного походження.

Ключові слова: географічні культури, екотип, бук лісовий, збереженість.

Doctorate I.I. Delehan – NUFWT of Ukraine

Conservation of the Beech Trees (*Fagus Silvatica* L.) of Different Ecotypes in Geographic Crops in Roztochya

Geographic crops of the beech (*Fagus silvatica* L.), which were created according to the International program IUFRO in 1995 are characterized. The results of the study of conservation of beech trees depending from the geographic origin are given.

Keywords: geographic crops, ecotype, beech (*Fagus silvatica* L.), conservation.

Збереження й відтворення лісів в умовах глобального потепління клімату потребує подальших поглиблених досліджень з метою отримання нових даних стосовно збереженості, особливостей росту та розвитку екотипів, основних лісоутворюючих порід у різному середовищі.

Однією з таких порід є бук лісовий, географічні культури якого й послужили об'єктом дослідження. Закладені культури весною 1995 р., у Страдцівському навчально-виробничому лісокомбінаті. Дослідний об'єкт створено в рамках Міжнародної програми – "Оцінка генетичних ресурсів бука у Європі" під керівництвом професора, д-ра біол. наук Г.Т. Криницького. У цьому загальноєвропейському експерименті беруть участь 23 країни, в тому числі і Україна. Аналогічні культури бука за уніфікованою методикою створено в 22 пунктах Європи [1].

Розміщення блоків у географічних культурах бука показано на рис. 1. Як видно з цього рисунка, кожен екотип висаджений у трьох блоках з трикратною повторністю. Блок, у свою чергу, складається з п'яти рядів по десять садивних місць у кожному (рис. 2).

¹ delehan@lviv.farlep.net