

16. Bogdan S. Genetic Variation in Growth Traits in a *Quercus robur* L. Open-Pollinated Progeny Test of the Slavonian Provenance / S. Bogdan, I. Katicic-Trupcevic, D. Kajba // *Silvae Genetica*. – 2004. – 53 (5-6). – P. 198-201.

17. Ruotsalainen S. Predicting Genetic Gain of Backward and Forward Selection in Forest Tree Breeding / S. Ruotsalainen, D. Lindgren // *Silvae Genetica*. – 1998. – 47 (1). – P. 42-50.

18. Zanetto A. Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl / A. Zanetto, G. Roussel, A. Kremer // *Forest Genetics*. – 1984. – 1(2). – P. 111-123.

Гайда Ю.И., Лось С.А., Терещенко Л.И., Яцык Р.М., Нейко И.С., Ольховский А.Ф. Генетическая изменчивость показателей роста полусибсов *Quercus Robur* L. в испытательных культурах Западного Подолья

Отражена динамика и изменчивость роста 14- и 23-летних потомств дуба обыкновенного в испытываемых культурах в ДП Чертковске ЛГ Тернопольской области. Определены полусибсы, которые растут достоверно лучше контроля. Установлено, что в структуре общей изменчивости показателей роста господствующее положение занимает дисперсия в пределах семей плюсовых деревьев. Показатели прогнозной эффективности отбора свидетельствуют о перспективности развития клонового напавления в семеноводстве дуба.

Ключевые слова: испытываемые культуры, плюсовые деревья, полусибс, коэффициент наследования, эффективность отбора.

Hayda Yu.I., Los S.A., Tereschchenko L.I., Yatsyk R.M., Neyko I.S., Olchovsky A.F. Genetic variation of growth traits in a *Quercus Robur* L. progeny test in West Podillya

In this article dynamics and variation in growth traits in 14 and 23-years old *Quercus robur* L. open-pollinated progeny test in State Forest Enterprise Chortkiv in Ternopil region are reflected. Half-sibs, that grow best than control, are recognized. The evaluation of variation components showed that variance within families contributed most to total variance. The estimated expected genetic gains suggest perspective of further development in clonal breeding of pedunculate oak.

Keywords: progeny test, plus trees, half-sibs, heritability, genetic gains

УДК 577*632.4

Ст. наук. співроб. В.А. Ковальова, канд. біол. наук –
НЛТУ України, м. Львів

ДЕФЕНЗИНИ В ГЕНОМАХ РОСЛИН РОДИНИ *PINACEAE*

У геномах рослин родини *Pinaceae* знайдено коло 250 дефензиноподібних послідовностей, які класифіковано у 4 групи згідно зі структурною гомологією. Показано мультигенний характер групи дефензинів у голонасінних. Порівняння виявлених у базах даних DEFLs голонасінних показало, що в їхній структурі збережені консервативні для рослинних дефензинів амінокислотні залишки – це 8 цистеїнових, два гліцинових, сериновий, ароматичний залишок на одинадцятій позиції та глутамінова кислота на двадцять восьмій.

Ключові слова: дефензин, *Pinaceae*.

Вступ. У процесі еволюції у рослин розвинулась багаторівнева система захисту від потенційно патогенних організмів. Центральне місце у ній належить пептидам із антимікробними властивостями, до яких належать тіоніни, ліпід-трансферні білки, кнотини, гевейні, снейкіни, дефензини. Серед них тільки останні є консервативною групою, яка, як компонент вродженого імунітету, представлена у багатьох класах багатоклітинних організмів, зокрема і людському.

Рослинні дефензини – це група невеликих (45-54 а.з.) катіонних секреторних білків, основу молекули яких утворює домен gamma-thionin із характерним розташуванням 4-5 дисульфідних мостиків. Дефензини рослин варіабельні за своєю первинною структурою, що позначилося й на їхній біологічній активності. Захисна функція рослинних дефензинів зумовлена їхньою антифунгальною, антибактеріальною та інсектицидною активністю, деякі з цих білків є інгібіторами протеаз [1].

Гени дефензинів експресуються конститутивно у поверхневих шарах клітин насіння, листя, бульб, фруктів та генеративних органів рослин. Очевидним доказом захисної ролі дефензинів у рослин є індукція їхнього синтезу у вегетативних органах під впливом абіотичних і біотичних чинників.

Кількість відкритих дефензиноподібних послідовностей (DEFensin-Like sequence – DEFLs) у геномах рослин швидко збільшується, наразі їх налічується близько 1100 у 62 видів рослин, переважну більшість із них ідентифіковано у трав'яних видів, геномні бази яких швидко поповнюються. Поряд із великою кількістю DEFLs, які були ідентифіковані в геномах рослин, близько 100 рослинних дефензинів із різних видів було очищено та досліджено їх активність проти широкого спектра фітопатогенних організмів *in vitro*, а також вплив на культури тваринних та рослинних клітин.

За даними літератури, геноми рослин містять від 15 до 50 генів дефензинів. Так, нещодавно з використанням потужних інформаційних ресурсів TAIR (The Arabidopsis Information Resource) та Uniprot було виявлено 317 DEFLs у *Arabidopsis thaliana*, які об'єднані в геномі у 16 кластерів [2], тому логічним виглядало припущення про існування мультигенної родини дефензинів у хвойних.

Мета роботи – виявити дефензиноподібні послідовності в електронних базах даних геномів хвойних рослин і здійснити їх класифікацію за гомологією первинних структур.

Результати досліджень та їх обговорення. За останні роки істотно збільшилась кількість DEFLs голонасінних у електронних базах GenBank. Так, ще у 2004 р. в базі даних "non-redundant protein sequences" було представлено лише три послідовності дефензинів голонасінних: дві *Picea abies* (SPI1 та SPI1B) і одна *Ginkgo biloba* (GbD1), а на сьогодні їх налічується 14 [3]. Серед них два дефензини сосни звичайної (PsDef1 і PsDef2), які було відкрито в лабораторії молекулярно-генетичних маркерів рослин НЛТУ України [4, 5]. Пошук інших DEFLs хвойних рослин здійснювали у спеціальному підрозділі GenBank – dbEST, де представлені послідовності генів, які експресуються, – EST (Expressed Sequence Tags) [6]. У цих базах даних для *Pinus taeda* налічується 329469 EST, *Picea sitchensis* – коло 200 тис., *Pinus pinaster* – 145620 EST. Для біоінформативного пошуку і аналізу гомології кДНК дефензинів використовували алгоритми електронної служби BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI): blastp, blastn, tblastx, tblastn [7].

Спочатку як запит (query) вибрали клоновані та секвовані нами нуклеотидні послідовності PsDef1 та PsDef2. Було виявлено близько 120 EST у базах даних *Pinus taeda*, 25 EST – *Pinus pinaster*, 40 EST – *Picea glauca* та *Picea sitchensis* з високим ступенем статистичної підтримки спорідненості (E-

value <5e-42). Оскільки всі виявлені послідовності були подібними (ідентичність – 70-98 %), то разом з відомими дефензинами *Pinaseae* вони були об'єднані в одну групу, яку умовно позначили "А" (рис. 1, а).

Найменш споріднені до PsDef1 (50 % ідентичності) дефензиноподібні послідовності виявлено в кДНК-бібліотеках *Pinus taeda*, сконструйованих з ембріональних клітин, – їхня кількість становила 30 EST. Детальний аналіз цих DEFLs показав, що їх амінокислотна послідовність містить 51 амінокислотний залишок (а.з.), тобто, на один а.з. більше ніж у DEFLs групи "А". Це дало підстави стверджувати, що ці послідовності формують окрему групу – "Г". До інших груп "Б" і "В" ми відносимо послідовності, які були ідентифіковані, коли як запит використовували послідовності, найменш ідентичні до представників виділених нами груп "А" і "Г" (рис.). У табл. 1 наведено результати порівняння спорідненості DEFLs різних груп.

Табл. Спорідненість* дефензиноподібних послідовностей різних груп, %

Групи	Група А	Група Б	Група В	Група Г
Група А		57 (70)	60 (70)	50 (66)
Група Б	57 (70)		58 (78)	57 (74)
Група В	60 (70)	58 (78)		72 (84)
Група Г	50 (66)	57 (74)	72 (84)	

Примітка: * – у таблиці наведено значення ідентичності і подібності (в дужках), які були отримані внаслідок попарного порівняння найменш гомологічних послідовностей

Група А		10	20	30	40	50	
	№ експону	*	*	*	*	*	*
PsDef1	ABO61348	-RMCKTPSGK	FKGYCVNNIN	CKNVCRTGEF	PTGSC-DFHV	AGRKCVCYKP	CP
PsDef2	ABO61349	-RMCKTPSAK	FKGYCVSSTN	CKNVCRTGEF	PTGSC-DFHI	TSRKCVCYKP	CP
PIC_SI	ABK21016	-RMCKTPSSK	FKGYCVSSTN	CKNVCRTGEF	PTGSC-DFHV	ASRKCVCYKP	CP
SPI1	CAA62761	-RTCKTPSGK	FKGVCASSNN	CKNVCQTEGF	PSGSC-DFHV	ANRKCVCYKP	CP
PIC_SI	ABK23404	-RTCKTPSGK	FKGVCASSNN	CKNVCQTEGF	PSGSC-DFHV	ANRKCVCYKP	CP
PgD1	AAP84643	-RTCKTPSGK	FKGVCASSNN	CKNVCQTEGF	PSGSC-DFHV	ANRKCVCYKP	CP
SPI1B	AAN40688	-RTCKTPSGK	FKGVCASSNN	CKNVCQTEGF	PSGSC-DFHV	ANRKCVCYKP	CP
PIN_TA	CVO33817	-RTCKTPSGK	FKGYCVNNTN	CKNVCRTGEF	PTGSC-DFHV	AGRKCVCYKP	CP
PIN_PI	CR392447	-RMCKTPSSK	FKGYCVSSTN	CKNVCRTGEF	PTGSC-DFHV	AGRKCVCYKP	CP
Група Б							
PIN_PI	AL750600	KRTCKARSHK	FKGHCGRSAN	CKAICKTEGF	EEGSC-HHHH	LKKRCFCEKP	C-
PIN_TA	CO158128	TRTCKARSHK	FKGHCGRSAN	CKAICKTEGF	EEGSC-HHHV	LKKRCFCEKP	C-
Група В							
PIN_TA	CF666355	-RTCESQSHK	FKGYCVRSNN	CKVVCQTERF	HTGSCRHTHF	GNRRCFCEKP	C-
PIC_SI	CO215917	-RMCESQSHK	FKGYCVRSNN	CKVVCQTERF	LTGSCRHTHF	GNRRCFCEKP	C-
PIN_TA	DN614645	-RTCLSQSHR	FRGYCVRSNN	CKQICQTERF	LSGACRHTHL	GNRRCFCEKP	C-
Група Г							
PIN_TA	DN615312	-RTCLSRSHR	FRGYCVRSNN	CKEIQTERF	LSGECRHTPL	GNRRCFCEKP	CT
PIN_TA	DN611290	-RTCLSRSHR	FRGYCVRSNN	CKEIQTERF	LTGECRHTHL	GNRRCFCEKP	CA
а)							
DEFL		X _n - CX _n - C - X _n - C - X ₃ - C - X _n - C - X _n - C - X ₁ - C - X ₃ - C - X _n	45-51 а.з.				
Група А		X ₂ - CX ₁₀ - C - X ₅ - C - X ₃ - C - X ₉ - C - X ₈ - C - X ₁ - C - X ₃ - C - X ₁	50 а.з.				
Група Б		X ₃ - CX ₁₀ - C - X ₅ - C - X ₃ - C - X ₉ - C - X ₈ - C - X ₁ - C - X ₃ - C - X ₈	50 а.з.				
Група В		X ₂ - CX ₁₀ - C - X ₅ - C - X ₃ - C - X ₉ - C - X ₉ - C - X ₁ - C - X ₃ - C - X ₀	50 а.з.				
б)							
Група Г		X ₂ - CX ₁₀ - C - X ₅ - C - X ₃ - C - X ₉ - C - X ₉ - C - X ₁ - C - X ₃ - C - X ₁	51 а.з.				

Рис. Множинне вирівнювання дефензиноподібних амінокислотних послідовностей *Pinaseae* (а): зірочками позначені консервативні для всіх рослинних дефензинів амінокислотні залишки (а.з.): PIC_SI – *Picea sitchensis*, PIN_TA – *Pinus taeda*, PIN_PI – *Pinus pinaster*, PgD1 – дефензин 1 *Picea glauca*, Загальний мотив кожної групи DEFLs (б): X_n – кількість амінокислотних залишків, C – цистеїн

Групу "А" утворюють послідовності відомих дефензинів *Pinaceae*: *Picea abies* (SPI1 та SPI1B), *Picea glauca* (PgD1), *Picea sitchensis* (unknown Acc.# ABK21016, ABK23404), *Pinus sylvestris* (PsDef1 та PsDef2). До цієї групи ми також зарахували EST із бібліотек *Pinus taeda* та *Pinus pinaster*, які кодують гомологічні послідовності. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей представників роду *Pinus* виявив їх 95-100 % подібність, аналогічно це стосується і представників роду *Picea*. Істотніші відмінності спостерігаються під час порівняння DEFLs хвойних різних родів, тоді подібність становить 88-94 %.

До групи "Б" увійшли послідовності відповідних EST, які було виявлено в бібліотеках кДНК, сконструйованих із тканин кореня сіянців *P. taeda* та *P. pinaster*. У базах даних було ідентифіковано лише 4 клони, по 2 в кожній бібліотеці. Ідентичність між послідовностями різних видів сосни групи "Б" становила 95 %. DEFLs групи "Б" широко представлені в кДНК бібліотеках родів *Picea* (25 клонів) та *Pinus* (18 клонів), на рис. а представлені найменш подібні послідовності, ідентичність між якими становить 85 %. Група "Г" охоплює високогомологічні послідовності з кДНК-бібліотек ембріональних тканин *Pinus taeda*, ідентичність їх дуже висока – 98 %.

Порівняння виявлених у базах даних DEFLs голонасінних показало, що в їхній структурі збережені консервативні для рослинних дефензинів амінокислотні залишки – це 8 цистеїнових (позиції 4, 15, 21, 25, 35, 45, 47, та 51), два гліцинових (13 та 33), сериновий (8), ароматичний залишок на одинадцятій позиції та глютамінова кислота на двадцять восьмій. Крім цих а.з., для наведених на рис. а послідовностей, що належать до різних груп, консервативними є основні амінокислоти, які зумовлюють позитивний заряд молекули. Зазвичай, рослинні дефензини – це позитивно заряджені білки за нейтрального рН, але величина заряду дуже варіабельна від +2 у Rs-AFP1 до +9 у SoD2. Представникам усіх чотирьох груп DEFLs *Pinaceae* властивий високий позитивний заряд за рН 7,0: група "А" – 6,7; група "Б" – 8,1; група "В" – 7,9; група "Г" – 6,0, що може свідчити про високу антимікробну активність, аналогічну активності очищеного нами дефензину сосни.

Як видно з рис. 1 б, існують і істотні відмінності в первинній структурі представників різних груп. По-перше, як уже відзначалось, послідовність зрілої форми дефензину у представників групи "Г" містить 51 а.з. на відміну від 50 а.з. у інших груп. По-друге, це різниця у кількості амінокислот між консервативними цистеїнами: так у групі "Б" присутній додатковий а.з. з N-кінця послідовності, а у груп "А" і "Г", навпаки, у C-кінці. Кількість а.з. між п'ятим і шостим цистеїновими залишками у груп "А" і "Б" – 8, а у груп "В" і "Г" – 9. Як видно зі загального лейтмотиву DEFLs ($-X_n-C-X_n-C-X_n-C-X_3-C-X_n-C-X_n-C-X_1-C-X_3-C-X_n$) [2], усі наведені структурні відмінності стосуються лише варіабельних ділянок домену, а консервативні консенсуси збережені у всіх групах.

Отже, отримані результати свідчать про існування у голонасінних мультигенної родини дефензинів, подібно до покритонасінних. Ми виявили близько 250 дефензиноподібних послідовностей у рослин родини *Pinaceae*,

що дало змогу класифікувати їх у чотири групи, згідно зі структурною гомологією. Ми не визначили істотної подібності DEFLs голонасінних з дефензинами покритонасінних, властивості яких добре вивчені. Чи належать виявлені послідовності голонасінних до одної функціональної групи, як впливають структурні відмінності на спектр їх біологічної активності? Виділення ендогенних або отримання рекомбінантних білків, які б належали до виявлених нами груп, дало б змогу з'ясувати ці питання. Можливо, подальші дослідження виявлять і інші, окрім захисної, функції рослинних дефензинів.

Література

1. **Thomma BPHJ.** Plant defensins / BPHJ Thomma, BPA Cammue, K. Thevissen // *Planta*. – 2002. – 216. – P. 193-202.
2. **Silvestein K.** Genome organization of more 300 defensin-like genes in *Arabidopsis* / K. Silvestein, M. Graham, T. Paape, K. VandenBosh // *Plant Physiol.* – 2005. – 138, No. 4. – P. 600-610.
3. [Електронний ресурс]. – Доступний з <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects>.
4. **Kovaleva V.** Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings / V. Kovaleva, R. Kiyamova, R. Cramer, H. Krynytskyi, I. Gout, V. Filonenko, R. Gout // *Peptides*. – 2009. – 30, № 12. – P. 2136-43.
5. **Ковальова В.А.** Молекулярне клонування та характеристика дефензину 2 сосни звичайної / В.А. Ковальова, Р.Т. Гут // *Цитология и генетика*. – 2008. – Т. 42, № 6. – С. 57-62.
6. [Електронний ресурс]. – Доступний з <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantESTBLAST.shtml>.
7. [Електронний ресурс]. – Доступний з <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Ковалева В.А. Дефензини в геномах растений семьи Pinaceae

В геномах растений семьи Pinaceae найден круг 250 дефензинообразных последовательностей, которые классифицированы в 4 группы согласно структурной гомологии. Показан мультигенный характер группы дефензинов в голосеменных. Сравнения обнаруженные в базах данных DEFLS голосеменных показало, что в их структуре сохранены консервативные для растительных дефензинов аминокислотные остатки – это 8 цистеиновых, два глициновых, сериновый, ароматический остаток на одиннадцатой позиции и глутаминовая кислота на двадцать восьмой.

Ключевые слова: дефензин, Pinaceae.

Kovaleva V.A. Defensins in plant genomes of Pinaceae family

It was revealed near 250 defensin-like sequences in genomes of Pinaceae family, which were classified into four groups according to homology of their primary structures. Multigene defensin family in Gymnosperms was discovered. In bases given of DEFLS of golonasinnikh rotined comparisons discovered, that conservative for vegetable defenziniv amino acid tailings are stored in their structure – it 8 cisteinovikh, two glicinovikh, serinovi, aromatic remain on the eleventh position and glutaminova acid on twenty to eighth.

Keywords: defensin, Pinaceae

УДК 630*548

Аспір. С.Л. Коній; доц. Ю.Й. Каганяк, д-р с.-г. наук;
проф. Л.І. Коній, д-р с.-г. наук – НЛТУ України, м. Львів

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ ГРАБОВО-ДУБОВИХ ДЕРЕВОСТАНІВ В УМОВАХ СВІЖИХ ДІБРОВ

Здійснено аналіз поширення дубових деревостанів у межах регіону досліджень. Досліджено динаміку абсолютної повноти, запасу, кількості дерев, середніх видових чисел високобонітетних, високоповнотних грабово-дубових насаджень у свіжих гру-