

wing difference of content of physiologically active substances in different parts of the seed has been discovered. Low activity of the stimulators of growth and relatively high activity of the inhibitors of growth in the seeds was studied.

Keywords: *Magnolia*, seed, sarkotesta, sklerotesta, embryo, endosperm, stimulators, inhibitors, biotesting.

УДК 630*232.3 *Аспір. Ю.М. Юсипович; ст. наук. співроб. В.А. Ковальова, канд. біол. наук; проф. Р.Т. Гут, д-р біол. наук – НЛТУ України, м. Львів*

ОРГАНОСПЕЦИФІЧНА ЕКСПРЕСІЯ ДЕФЕНЗИНУ 1 (PSDEF1) У *PINUS SYLVESTRIS* L.

Наведено дані про експресію дефензину PsDef1 у вегетативних і генеративних органах 15-річної сосни звичайної, а також у насінні та різних частинах проростків (корінці, гіпокотилі і сім'ядолі). Виявлено продукти транскрипції PsDef1 у пилку та макростробілах поточного року, зрілому насінні, хвої, корінні та корі сосни. Отримані результати свідчать про конститутивну експресію цього білка в більшості органів сосни, що є підтвердженням його захисної ролі на всіх етапах онтогенетичного розвитку сосни звичайної.

Ключові слова: дефензин 1, органоспецифічна експресія, сосна звичайна.

Вступ. У системі рослинного світу існує чимало механізмів імунного захисту рослинних організмів проти патогенного впливу. Провідна роль в цьому процесі належить антимікробним білкам (PR). Дефензини рослин є представниками цієї групи біологічно активних сполук за назвою PR-12. Дефензини присутні в насінні, вегетативних та генеративних органах покритонасінних рослин. Рослинним дефензинам властивий широкий спектр біологічної активності – антифунгальна, антибактеріальна, інгібування протеїназ та α -амілаз, блокування іонних каналів плазматичної мембрани патогена [15]. Експресія рослинних дефензинів може відбуватися конститутивно або індуковано під впливом грибків, гормонів, холоду, посухи, поранення та іонного навантаження [2, 10]. Раніше ми виявили дефензин 1 (PsDef1) у сосни звичайної – поліпептид з молекулярною масою 5,6 кДа, який належить до морфогенної групи дефензинів і проявляє антигрибкову активність проти *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Heterobasidion annosum*, *Botrytis cinerea* та *Pythium dimorphum* [3, 4, 9]. Молекулярне клонування та розроблення методики отримання рекомбінантного й ендогенного PsDef1 були здійснені у лабораторії молекулярно-генетичних маркерів рослин кафедри лісівництва НЛТУ України (Асс. No. EF455616). Первинна структура молекули PsDef1 зберігає консервативні послідовності, характерні для рослинних дефензинів. кДНК PsDef1 кодує білок, який складається з 83 амінокислотних залишків (а.з.), з них – 50 а.з. утворюють основний домен дефензину, а 33 а.з. – №-кінцевий сигнальний пептид, який внаслідок процесингу відокремлюється від структурного білка [2, 10]. У голонасінних конститутивна експресія характерна для дефензину PgD1 сіянців ялини блакитної – *Picea glauca*, SPI1 і SPI1B у *Picea abies* – ялини європейської та для дефензину GbD1 *Ginkgo biloba* [1, 7, 12]. Вивчення експресії дефензинів необхідне для розуміння механізмів природного захисту деревних рослин проти патогенного впливу, зокрема для підвищення продуктивності та збереженості сіянців хвойних. Метою цього дослідження було визначення

експресії PsDef1 за нормальних умов у насінні, проростках, вегетативних і генеративних органах сосни звичайної на рівні мРНК.

Матеріали і методи. У дослідях використано насіння *Pinus sylvestris* L., надане Львівською зональною лісонасінневою станцією. Хвою, коріння, бруньки, кору, а також макростробіли, мікростробіли та пилок відібрано з 15-річної сосни Дендроботанічного саду НЛТУ України. Використано корінці, гіпокотилі і сім'ядолі восьмиденних проростків сосни звичайної, вирощених за температури 25 °C в чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою.

мРНК виділяли за модифікованим методом Chang et. al. [6]. На основі сумарної РНК отримували кДНК шляхом полімеразної ланцюгової реакції з попередньою зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Реакційна суміш приготувана на обробленій диетилпірокарбонатом (ДЕПК) мілії H_2O , містила 2 мкл загальної РНК; 0,5 мМ нуклеотидів (dNTPs), 5 мкМ праймерів оліго- $d(T)_{15}$, яку нагрівали на водяній бані 5 хв за 65 °C з наступним додаванням буферу для зворотної транскрипції та 1,5 од/мкл зворотної транскриптази RevertAidTM Premium (Fermentas). Суміш інкубували 30 хв за 50 °C. Реакцію завершували нагріванням на водяній бані до 85 °C протягом 5 хв.

Отриману кДНК ампліфікували за допомогою ампліфікатора "Proteus Helena BioSciences". Для ПЛР-аналізу підібрано праймери, специфічні для гена PsDef1 з такою послідовністю: прямий – 5'-GGGATGATGCAGGTTCAAGT-3' і зворотний – 5'-ACATTTTCTGCCAGCCACAT-3', що утворювали продукт довжиною 159 п.н. Як контроль транскрипції слугував ген 60 s рибосомального білка L 44 (Асс. No. EL 342388.1). Ампліфікацію кДНК L 44 проводили за допомогою таких праймерів: прямий – 5'-CAAAGCTTGCAAAAAGCACA-3' та зворотний – 5'-TTCCCTTCCCCTTCTTGTCT-3', розмір продукту становив 263 п.н. Загальна суміш для ПЛР об'ємом 25 мкл, приготувана на мілії H_2O , містила однократний МТЕ буфер; 2,5 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ dNTPs (Fermentas); 0,8 пМ/мкл кожного праймера, 1 мкл кДНК та 1 од/мкл AmiPol Hot Start ДНК-полімерази (Molecular Tools). Параметри проведення ПЛР: 95 °C – 5 хв; 95 °C – 1 хв; 51,4 °C – 1 хв; 72 °C – 1 хв (30 циклів); 72 °C – 10 хв. Продукти ПЛР розділяли в 2 % агарозному гелі у 0,5 % трис-боратному буфері, забарвлювали бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), візуалізували за допомогою УФ-транслюмінатора та фотографували.

Результати та обговорення. Для дослідження експресії гена PsDef1 на рівні мРНК необхідно було визначити специфічні праймери до кодуєчої послідовності (Асс. No. EF455616) із 252 нуклеотидів (рис. 1.).

EF455616 PsDef1

```
ATGGCGGGCAAGGGAGTTGGCAGTCGACTCAGCACTCTTTTCTGCTCG
TGCTGCTTGTATAACCAT GGGATGATGCAGGTTCAAGT TGCAGAGGG
CCGAATGTGCAAAACCCCGAGCGGCAAGTTCAAAGGGTATTGTGTGAACAA
CACCAACTGCAAAAATGTTTGCCGCACTGAGGGATTTCCAACGGGAAGTTGC
GATTTCCATGTGGCTGGCAGAAAATGTTACTGTTACAAACCCTGCCCTTGA
```

Рис. 1. Нуклеотидна послідовність кДНК PsDef1.

Курсивом виділено нуклеотидну послідовність зрілої форми дефензину 1 сосни звичайної, звичайним шрифтом – сигнальний пептид.

Підкреслено нуклеотидні послідовності праймерів

Оскільки відомо, що гени дефензинів містять інтрон між двома екзонами, які кодують сигнальний пептид та зрілу форму дефензину, то для запобігання отримання псевдопозитивного сигналу від можливих домішок геномної ДНК було підібрано праймери таким чином, що прямий належав до сигнального пептиду, а зворотний – до зрілої форми дефензину PsDef1. Очікувана довжина ампліфікованого продукту – 159 п.н.

Сосна звичайна, як і більшість хвойних порід, відновлюється тільки насіннєвим шляхом. Генетична якість насіння визначально впливає у кінцевому результаті на формування біологічно стійких і високопродуктивних насаджень цієї лісотвірної породи, тому для аналізу експресії дефензину 1 ми обрали незріле та зріле насіння сосни звичайної. У незрілому насінні, яке зібране із серпневих дворічних мегастробіл, продукти PsDef1 на електрофореграмі не детектувалися, проте у зрілому насінні, у стані його спокою, добре візуалізувалися транскрипти цього дефензину (рис. 2.).

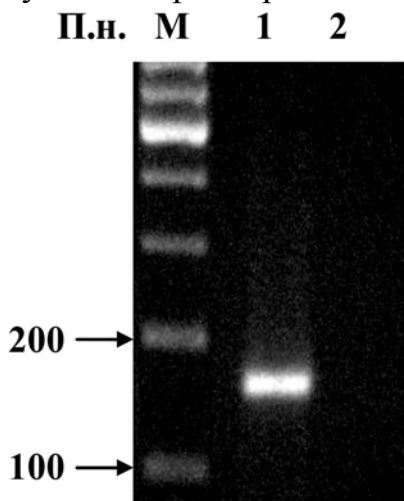


Рис. 2. Продукт ампліфікації кДНК із зрілого (доріжка 1) та незрілого насіння сосни звичайної (доріжка 2) зі специфічними праймерами.
М – маркери. П.н. – пар нуклеотидів

Можливо, відсутність ампліфікованого продукту в незрілому насінні пов'язана з тим, що основну функцію захисту на цьому етапі формування насіннини виконують міцні тканини мегастробіли. Зріле насіння безпосередньо контактує із патогенагресивним середовищем і в процесі його дозрівання задіюються механізми захисту, зокрема розпочинається експресія дефензинів. У покритонасінних дефензини очищено з насіння таких рослинних родин, як *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae*, *Saxifragaceae* та *Roaceae* [13]. Ці дослідження свідчать про те, що рослинні дефензини є компонентом системи антимікробного захисту в насінні багатьох представників покритонасінних, а також можуть виконувати таку ж роль і в насінні голонасінних. Адже присутність транскриптів дефензину PsDef1 у тканинах сухого насіння сосни звичайної, як і в багатьох інших покритонасінних, надає перевагу насінині успішно проростати, формувати повноцінний проросток у патогенагресивному середовищі. За допомогою анти-PsDef1антитіл ми виявили експресію дефензину у проростках сосни звичайної, вміст цього пептиду збільшувався у процесі видовження проростка [5]. Підтвердження експресії гена дефензину 1 у проростках ми отримали і методом ЗТ-ПЛР. Варто зазначити, що продукт ампліфікації детектувався в усіх частинах проростка: корінцях, гіпокотилі та сім'ядолях (рис. 3).

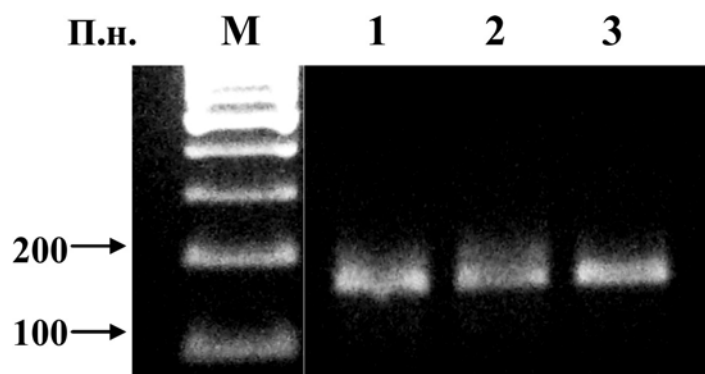


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації кДНК із різних частин проростків сосни із специфічними до дефензину 1 праймерами:

М – Маркери; 1 – корінці; 2 – гіпокотилі; 3 – сім'ядолі

У процесі проростання насіння формуються проростки, які у відкритому ґрунті можуть контактувати зі спорами чи міцелієм фітопатогенних грибів. Високий рівень експресії дефензину PsDef1 в корінцях, у гіпокотиліях та сім'ядолях зумовлений безпосереднім контактуванням усієї поверхні проростка із ґрунтом, адже через відсутність ще несформованої твердої клітинної стінки проростки дуже чутливі до механічного пошкодження, що сприяє патогенній інвазії. Аналіз баз даних EST NCBI показав, що дефензиноподібні послідовності присутні у кДНК бібліотеках із хвої і коренів інших видів хвойних рослин. Вестерн-блот аналізом із використанням антидефензин 1 антитіл нам не вдалося виявити імунореактивні смуги в екстрактах протеїнів із хвої, кори та коренів дорослих дерев сосни. Застосувавши для дослідження експресії дефензину 1 у тканинах 15-річної сосни більш чутливий метод – ЗТ-ПЛР, ми виявили амплікон очікуваної довжини – 159 п.н. в коренях, корі, хвої та насінні сосни (рис. 4, доріжки 1, 2, 3, 4). Подібний профіль експресії був описаний для дефензину 1 *Picea glauca* (PgD1), який на 87 % гомологічний дефензину сосни [11]. Отримані нами результати вказують на конститутивний характер експресії PsDef1 у тканинах різних органів сосни звичайної. У вегетативних бруньках продукт ампліфікації не виявлено (рис. 4, доріжка 5), що свідчить про тканиноспецифічний характер експресії дефензину 1 сосни, подібно як і в покритонасінних рослин [14].

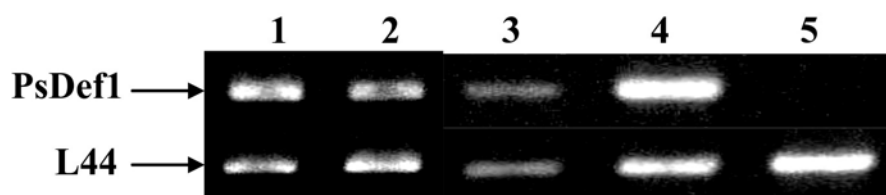


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації кДНК сумарної РНК із різних тканин сосни звичайної зі специфічними праймерами до PsDef1 та рибосомального білка L44: 1 – кора 15-річної сосни; 2 – хвоя 15-річної сосни; 3 – зріле насіння; 4 – коріння 15-річної сосни; 5 – вегетативні бруньки 15-річної сосни

У генеративних органах низки квіткових рослин, переважно, у зовнішніх клітинних шарах пелюсток, чашолистків, у пиляках та стовпчиках маточки виявлено експресію генів дефензинів [8]. Методом ЗТ-ПЛР ми встановили наявність продуктів транскрипції гена дефензину 1 у генеративних органах сосни звичайної: у макростробілах, що сформувалися на вегетативних пагонах поточного року, а також у мікростробілах та пилку (рис. 5, доріжки 1, 2, 3), хоча наявність продукту транскрипції у мікростробілах може бути і внаслідок експресії PsDef1 у пилку.

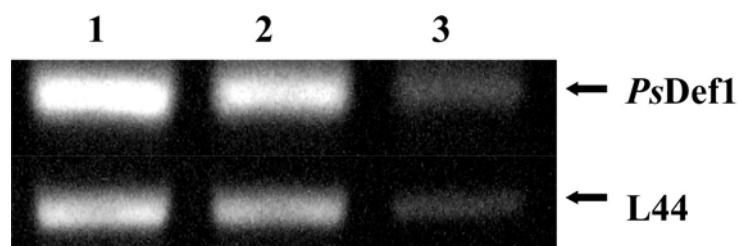


Рис. 5. Експресія гена *PsDef1* у генеративних органах 15-річної сосни звичайної:
1 – макростробіли, 2 – мікростробіли, 3 – пилок

Отже, ми отримали доказ залучення пептиду PsDef1 до захисту гаметофіту сосни звичайної проти потенційного його ураження патогенними організмами. Отримані результати підтверджують універсальність механізмів захисту проти фітопатогенних організмів як у покритонасінних, так і в голонасінних представників рослинного світу. Ми виявили, що експресія гена PsDef1 відбувається у зрілому насінні, проростках, вегетативних і генеративних органах сосни звичайної, що є свідченням участі дефензину в захисті рослини на всіх етапах її онтогенетичного розвитку.

Література

1. Ковальова В.А. Дефензини в геномах рослин родини Pinaceae / В.А. Ковальова // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2010. – Вип. 20.2. – С. 32-36.
2. Ковальова В.А. Отримання рекомбінантного дефензину 1 сосни звичайної та його антифунгальна активність / В.А. Ковальова, І.Т. Гут, Р.Т. Гут // Біополімери і клітина. – 2008. – Т. 24, № 5. – С. 337-385.
3. Ковальова В.А. Антифунгальні властивості дефензину *Pinus sylvestris* L. / В.А. Ковальова, Р.Т. Гут // Лісівництво України в контексті світових тенденцій розвитку лісового господарства : міжнар. наук.-практ. конф., 20-23 вер. 2006 р.: тези доп. – Львів, 2006. – С. 272-273.
4. Ковальова В.А. Виділення білків із фунгіцидною активністю з проростків сосни звичайної / В.А. Ковальова, Р.Т. Гут // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – 39. – С. 114-120.
5. Ковальова В.А. Аналіз експресії дефензину в процесі проростання насіння сосни звичайної / В.А. Ковальова, Г.Т. Криницький, Р.Т. Гут // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2007. – Вип. 17.8. – С. 24-27.
6. Юсипович Ю.М. Особливості виділення сумарної РНК з різних тканин сосни звичайної / Ю.М. Юсипович, В.А. Ковальова, Р.Т. Гут // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2010. – Вип. 20.5. – С. 37-41.
7. Fossdal C. 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 / C. Fossdal, N. Nagy, P. Sharma, A. Lonneborg // Plant Molecular Biology. – 2003. – Vol. 52, № 2. – P. 291-302.
8. Fung T. Lay Anderson. Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia / T. Lay Fung, F. Brugliera, A. Marilyn // Plant Physiology, March. – 2003. – Vol. 131. – P. 1283-1293.
9. Kovaleva V.A. Isolation and the antifungal activity of defensin-like protein from Scots pine roots / V.A. Kovaleva, R.T. Gout // Joint conference of UIFRO "Population genetics and genomics of forest trees: from gene function to evolutionary dynamics and conservation". October 1-6, 2006, Madrid. – P. 188-189.
10. Lay F.T. Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants / F.T. Lay, M.A. Anderson // Current Protein and Peptide Science. – 2005. – Vol. 6. – P. 85-101.
11. Pervieux I. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments / I. Pervieux, M. Bourassa, F. Laurans, R. Hamelin, A. Seguin // Physiol. Mol. Plant Pathol. – 2004. – Vol. 64. – P. 331-341.

12. Shena G. Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba* / G. Shena, Y. Pangb, W. Wub, Z. Miaoa, H. Qiana, L. Zhaoa, X. Sunb, K. Tanga // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 162. – P. 1160-1168.

13. Terras F.R.G. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds / F.R.G. Terras, H.M.E. Schoofs, M.F.C. De Bolle, F. Van Leuven, S.B. Rees, J. Vanderleyden, B.P.A. Cammue, W.F. Broekaert // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 5301-5309.

14. Thomma B. Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana* / B. Thomma, W. Broekaert // *Plant Physiol. Biochem.* – 1998. – Vol. 36. – P. 533-537.

15. Thomma B. Plant defensins / B. Thomma, B. Cammue, K. Thevissen // *Planta*. – 2002. – Vol. 216, № 2. – P. 193-202.

Юсипович Ю.М., Ковалева В.А., Гут Р.Т. Органоспецифическая экспрессия дефензина 1 (PsDef1) у *Pinus sylvestris* L.

Представлены данные об экспрессии дефензина PsDef1 в вегетативных и генеративных органах 15-летней сосны обыкновенной, а также в семенах и разных частях проростков (корешки, гипокотили и семядоли). Обнаружены продукты транскрипции PsDef1 в пыльце и макростробилах текущего года, зрелых семенах, хвое, корнях и коре сосны. Полученные результаты свидетельствуют об конститутивной экспрессии белка в большинстве органов сосны, что является подтверждением его защитной роли на всех этапах онтогенетического развития сосны обыкновенной.

Ключевые слова: дефензин 1, органоспецифическая экспрессия, сосна обыкновенная.

Yusypovych Yu.M., Kovalyova V.A., Gout R.T. The specific organ expression of defensins 1 (PsDef1) in *Pinus sylvestris* L.

The expression of defensin PsDef1 in vegetative and generative organs of 15-year-old Scots pine, also in seeds and differential shoot parts (root, hypocotyl and cotyledon) are given in the article. Transcriptional products of PsDef1 in pollen and current year macrostrobiles, mature seeds, needles, roots and bark of Scots pine are detected. These results show the constitutive expression of the protein in most of organs, that confirms a protein protect role on all ontogenetical stages of Scots pine development

Keywords: defensin 1, specific organ expression, Scots pine.

УДК 630* 67

Аспір. О.П. Ютовець¹ – Житомирський НАУ

ОЦІНКА РІВНЯ ДИВЕРСИФІКАЦІЇ ЛІСОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА НА ПІДПРИЄМСТВАХ ПОЛІССЯ УКРАЇНИ

Аналіз основних фінансово-економічних показників діяльності підприємств дозволив оцінити рівень диверсифікації лісогосподарського виробництва. Підкреслено роль диверсифікаційних процесів як засобу адаптації підприємства до кризових явищ в економіці.

Ключові слова: диверсифікація, лісогосподарське виробництво, деревообробка, експорт деревини, рентабельність.

Постановка проблеми. Перехід до ринкових відносин зумовлює зростання ролі економічних факторів у державному лісовому господарстві. Від суб'єктів лісогосподарської діяльності вимагається постійний вибір таких методів та шляхів підвищення ефективності виробництва, які дають змогу досягнути кращих результатів за раціональних обсягів витрат. Чільне місце у вирі-

¹ Наук. керівник: проф. В.П. Краснов, д-р с.-г. наук – Поліський філіал УкрНДІЛГА