

ROMAN GOUT, VALENTINA KOVALYOVA

Ograniczanie wzrostu organizmów fitopatogennych za pomocą defenzyny sosny pospolitej (*Pinus sylvestris* L.)

Inhibition of growth of the phytopathogenic organisms by Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) defensin

ABSTRACT

Gout R., Kovalyova V. 2008. Ograniczanie wzrostu organizmów fitopatogennych za pomocą defenzyny sosny pospolitej (*Pinus sylvestris* L.). Sylwan 8: 54-58.

The paper discusses the potential protection role of the defensin isolated from roots of *Pinus sylvestris* L. against various organisms including *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *Alternaria alternata*.

KEY WORDS

defensin, Scots pine, antifungal activity

ADDRESSES

Roman Gout – Katedra Leśnictwa; Narodowy Leśno-Techniczny Uniwersytet Ukrainy; ul. Generała Czupryny 103; 79057, Lwów-57 Ukraina; e-mail: gut@forest.lviv.ua

Valentina Kovalyova – Katedra Leśnictwa; Narodowy Leśno-Techniczny Uniwersytet Ukrainy; ul. Generała Czupryny 103; 79057, Lwów-57 Ukraina; e-mail: vakovaleva@yahoo.com

Wstęp

Ważnym kierunkiem w obecnych badaniach w leśnictwie jest zwiększenie produktywności lasotwórczych gatunków drzew. Jednakże cecha ta określana jest przez szereg abiotycznych i biotycznych czynników, wśród których najważniejsze i zarazem najbardziej ograniczające produktywność są organizmy fitopatogenne. Są to mikroorganizmy pochodzenia grzybowego, które stanowią najliczniejszą grupę bodźców chorób infekcyjnych upraw leśnych, będących przyczyną istotnych ekonomicznych strat w gospodarce leśnej. W kwestii zwiększania odporności roślin na stresowe czynniki otaczającego środowiska ważne miejsce zajmują badania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw reakcji na bodźce zewnętrzne.

Aktywizacja mechanizmów odporności jest związana z indukcją lub z wzmocnieniem ekspresji genów białek (PR-białka), włączonych do systemu reakcji rośliny na patogen [Van Loon 1985]. Do PR-białek należy także defenzyna – niskomolekularne zasadowe białko z dużą zawartością cysteiny. Białko to odgrywa kluczową rolę w ochronie roślin przed porażeniem grzybami [Broekaert i in. 1995].

Defenzyny zostały wydzielone z wielu gatunków jedno- i dwuliściennych roślin [Thomma i in. 2002]. Geny, które kodują defenzynopodobne białka, zostały zidentyfikowane także w genomach nagonasiennych z rodzajów *Picea* oraz *Ginkgo*. Jednakże same białka nie zostały wydzielone [Sharma, Lönnberg 1996]. W poprzednich badaniach zaobserwowano defenzynę także w białkowych ekstraktach siedmiodniowych kielków *Pinus sylvestris* L. [Kovalyova i in. 2005].

W laboratorium markerów molekularno-genetycznych Katedry Leśnictwa Narodowego Leśno-Technicznego Uniwersytetu Ukrainy została opracowana oryginalna metoda oczyszczenia endogennej defenzyny uzyskanej z kielków nasion sosny pospolitej [Kovalyova, Gout 2005]. Wydzielone białko zostało przetestowane na aktywność wobec fitopatogennych grzybów, które wywołują zgorzel siewek gatunków iglastych.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano nasiona *Pinus sylvestris* L. uzyskane z Państwowego Przedsiębiorstwa Buśkie Gospodarstwo Leśne znajdującego się w oblasti lwowskiej. Kultury fitopatogennych grzybów *Fusarium oxysporum* (UKM F-16753), *Alternaria alternata* (UKM F-50639) oraz fitopatogenicznej bakterii *Erwinia carotovora* (UKM B-1075) zostały udostępnione przez Instytut Mikrobiologii i Wirusologii Narodowej Akademii Nauk Ukrainy.

Nasiona sosny kielkowano przez siedem dni na nasączonym wodą destylowaną filtrze papierowym na szalkach Petriego w termostacie o temperaturze 26°C. Następnie kielki zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -70°C do dalszych badań.

Wyodrębnianie defenzyny z kielków sosny wykonywano według metodyki opisanej w pracach Kovalyovej i Gouta [2005] oraz Kovalyovej i in. [2006]. Zamrożone w ciekłym azocie kielki rozcierano w moździerzu do stanu proszkopodobnego. Białka ekstrahowano 50 mM kwasem siarczanowym (3 ml/g masy wilgotnej) w ciągu 1 godziny przy 4°C. Ekstrakt filtrowano przez gazę i wirowano z prędkością 14 000 obrotów przez 20 minut w wirówce (centyfudze) K-24 niemieckiej firmy Janetzki. Do cieczy dodawano kroplami 10 mililitrów NaOH aż do uzyskania pH równego 7,8. Następnie próbkę odstawiano na 30 min w temperaturze 4°C i wirowano ponownie. Białka z nad osadowej cieczy dzielono na frakcje w drodze osadzenia siarczanem amonu najpierw przy 35% nasyceniu. Osad wirowano z prędkością 14 000 obrotów przez 30 minut w temperaturze 4°C. Płyn oddzielano, a osad rozcieńczano. Następnie ciecz ogrzewano w ciągu 10 minut w temperaturze 85°C i ponownie wirowano przez 20 minut, tym razem zwiększając obroty do 20 000. Ciecz nadosadową dializowano. Następnie frakcję, która zawierała defenzynę, dializowano używając wody destylowanej i przechowywano w temperaturze -70°C do dalszych badań.

W celu ustalenia aktywności preparatu, białka cząsteczki grzybnia *A. alternata* inokulowano w szalkach Petriego (90×15 mm) 1,8% pożywką ziemniaczano-glukozową. Kiedy średnica kolonii osiągała 3 cm, sterylne dyski z bibuły filtracyjnej układano na pożywce agarowej w odstępnie 0,5 cm od skraju kolonii. Alikwoty (100 µl) preparatu defenzyny różnej koncentracji наносono na papierowe dyski. Jako kontrolę stosowano wodę destylowaną. Szalki inokulowano w temperaturze 26°C dopóki grzybnia nie porośla dysku kontrolnego i obok dysków z roztworem białka nie uformowały się strefy ingerowania [Lam i in. 2000].

Ilościową ocenę antygrzybowej aktywności defenzyny sosny wykonywano według pracy Cammue i in. [1992]. Spory zostały wydzielone z zarodnikujących kultur grzybów, które wyhodowano na 1,8% pożywce ziemniaczano-glukozowej. Zawiesinę zarodników filtrowano przez podwójną warstwę sterylnej gazy. Do jamek 96-jamkowego sterylnego mapnika dodawano po 80 µl zawiesiny ze sporami 2×10^4 spor/ml i po 20 µl roztworu defenzyny różnej koncentracji (0,5; 1; 5; 10 i 20 µg/ml). Mapniki inkubowano w ciemni w temperaturze 22°C. Po 48 godzinach wykonywano pomiary optycznej gęstości zawiesiny w każdej jamce z dokładnością 595 nm i obliczano znaczenie koncentracji (IC50) defenzyny, przy którym ma miejsce 50% ograniczenie wzrostu grzyba.

Wyniki i dyskusja

Wiadomo, że przy kiełkowaniu nasion jodły europejskiej ma miejsce ekspresja defenzynopodobnego białka SPI1, która wzrasta w korzeniach w przypadku zainfekowania siewek *Heterobasidion annosum* – fitopatogennym grzybem porażającym system korzeniowy gatunków iglastych [Fossdal i in. 2003]. Wykazano, że nadekspresja tego białka w komórkach embrjonalnych *Picea abies* pomaga powstaniu odporności (wytrzymałości) tych komórek na inwazję *H. annosum*, co potwierdza ważną rolę białka SPI1 w obronie organizmu roślinnego przed wpływem patogenów. Aczkolwiek te czynniki są ogólnie znane, jednak molekularne mechanizmy działania wzajemnego gospodarz-patogen są jeszcze mało zbadane. Pod tym względem ważne jest wydzielenie z gatunków iglastych endogennych defenzyn do badania ich potencjalnego działania przeciw mikrohomom.

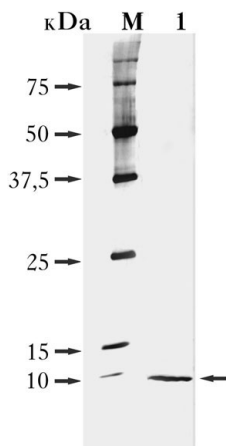
Wypracowana przez nas metoda zezwoliła po raz pierwszy oczyścić defenzyny przedstawiciela gromady nagonasiennych – sosny pospolitej [Kovalyova, Gout 2005]. Uzyskany elektroforetycznie preparat homogeny (ryc. 1.) został zbadany w celu określenia aktywności przeciw niektórym fitopatogenom gatunków iglastych (*Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Botrytis cinerea* oraz *Erwinia carotovora*).

Okazało się, że defenzyna sosny najbardziej aktywnie działa na *Botrytis cinerea* i przy koncentracji 0,1 $\mu\text{g/ml}$ w pożywce inhibituje na 50% wzrost kolonii grzyba (tab.). Jednakże przy koncentracji 10 $\mu\text{g/ml}$, nie zaobserwowano aktywności antybakteryjnej wobec *Erwinia carotovora*, co jednak jest charakterystyczne dla niektórych grup defenzyn.

Badania aktywności białka oczyszczonego z kiełków sosny wobec fitopatogennego grzyba *Alternaria alternata* pokazują, że po 72 godzinach od naniesienia roztworu na filtry dookola papierowych dysków formują się strefy inhibitowania wzrostu grzybni. (ryc. 2).

Defenzyny wydzielone z różnych gatunków roślin bardzo różnią się pod względem swych właściwości antygrzybowych. Wartość IC₅₀ dla defenzyny Rs-AFP1, oczyszczonej z *Raphanus sativus* wobec *Fusarium oxysporum* wynosi 30 $\mu\text{g/ml}$, a dla defenzyny Bn-AFP1 z *Brassica napus* – 1,3 $\mu\text{g/ml}$ [Terras i in. 1993]. Niektóre defenzyny nie wykazują właściwości przeciwgrzybowych, jednak charakteryzują się dużą aktywnością antybakteryjną.

Roślinne defenzyny mogą zmieniać morfologię mycelium grzyba, co jest jedną z oznak, według których się je klasyfikuje. Mikroskopowe badanie grzybni *F. oxysporum* pokazało, że



Ryc. 1.

Analiza preparatu defenzyny oczyszczonej chromatografią na fosfofelulozie, metodą DDC-Na-elektroforezy w gradiencie koncentracji 5-22% poliakrylamidu helu. Hel zafarbowany srebrem. Po prawej strzałką pokazano położenie defenzyny

Analysis of defensin preparation isolated by means of chromatography on phosphocellulose with application of electrophoresis in 5-22% helium polyacrylamide. Helium coloured with silver. Arrow on the right indicates location of defensin

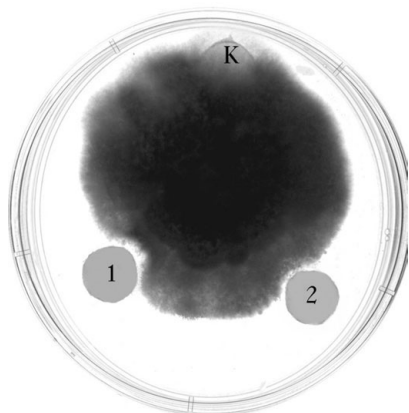
Tabela.

Aktywność defenzyny sosny pospolitej w stosunku do fitopatogennych organizmów
Scots pine defensin activity against phytopathogenic organisms

Organizm	IC50 [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Fusarium solani</i>	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	3,7
<i>Botrytis cinerea</i>	0,1
<i>Erwinia carotovora</i>	*

* nie wyznaczono przy koncentracji defenzyny poniżej 10 $\mu\text{g/ml}$

* not determined with defensin concentration below 10 $\mu\text{g/ml}$

**Ryc. 2.**

Wpływ defenzyny sosny na wzrost myceliumu *Alternaria alternata*

Influence of Scots pine defensin on growth of *Alternaria alternata* mycelium

Oznaczenia: K – woda destylowana; 1 – 10 μg preparatu; 2 – 5 μg preparatu

K – purified water; 1 – 10 μg of preparation; 2 – 5 μg of preparation

defenzyna sosny wywołuje zgrubienie strzępek grzyba i nasilenie ich pączkowania [Kovalyova i in. 2006]. Według tych właściwości antyfungalnych to białko jest bliskie przedstawicielowi morfogennej grupy defenzyn, ale jednak należy zaznaczyć, że swoją molekularną masą 9,8 kDa odróżnia się od klasycznych defenzyn roślinnych. Dalsze badania pierwotnej struktury tego białka pozwolą wyznaczyć jego miejsce wśród antyfungalnych białek roślinnych. Do ustalenia pełnej kolejności aminokwasowej defenzyny sosny będzie wykorzystany stworzony w naszym laboratorium bank genów *Pinus sylvestris* L., które się gromadzą w korzeniach siedmiodniowych kiełków.

Duża aktywność wydzielonego białka wobec fitopatogennych grzybów daje podstawę rozpatrywania możliwości jego zastosowania w selekcyjnych programach zwiększania odporności (wytrzymałości) gatunków iglastych na choroby infekcyjne. Jak pokazują liczne badania, poziom zmienności genetycznej populacji gatunków drzew, względnie odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne jest dość duży i propozycja stworzenia odpornych odmian nie wywołuje wątpliwości. Z reguły u zdrowych roślin poziom syntezy wielu PR-białek jest mały, chociaż niektóre z nich mogą akumulować się w zwiększonej ilości, jednak przy infekcji fitopatogenami poziom ich ekspresji wyraźnie wzrasta, nawet setki razy. Pod tym względem można rozpatrywać wykorzystanie defenzyny sosny jako markera we wczesnej diagnostyce chorób infekcyjnych gatunków iglastych.

Wnioski

✚ W laboratorium markerów molekularno-genetycznych Narodowego Leśno-Technicznego Uniwersytetu Ukrainy po raz pierwszy wyodrębniono z przedstawiciela klasy nagonasiennych – sosny pospolitej – endogenną defenzynę.

✚ Defenzyna sosny pospolitej przy koncentracji poniżej 5 µg/ml ogranicza wzrost grzybní szkodliwych grzybów *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Botrytis cinerea* oraz *Alternaria alternata*.

Literatura

- Broekaert W. F., Terras F. R. G., Cammue B. P. A., Osborn R. W. 1995. Plant definitions: novel antimicrobial peptides as components of the host system. *Plant Physiol.* 108: 1353-1358.
- Cammue B. P. A., De Bolle M., Terras F. R. G., Proost P., Damme J., Rees S., Vanderleyden J., Broekaert W. F. 1992. Isolation and characterization of novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228-2233.
- Fossdal C. G., Nagy N. E., Sharma P., Lönneborg A. 2003. 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.* 52:291-302.
- Kovalyova V., Kramer R., Gout I., Gout R. 2005. The analysis of tyrosine phosphorylation in the process of seed germination of Scots pine. *Ukr. Bioch. J. V. 77, N 2:* 119-120.
- Kovalyova V., Gout R. 2005. A new method of isolation of an antifungal protein from seedlings of Scots pine. *J. Scientific Herald NUFWT of Ukraine. V. 15,4:* 161-167.
- Kovalyova V., Gout I., Gout R. 2006. Characterization of defensin-like protein from Scots pine seedlings. *Biopolymers and Cell.* 22: 126-131.
- Lam Y. W., Wang H. X., Ng T. B. 2000. A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 74-80.
- Sharma P., Lönneborg A. 1996. Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce. *Plant Mol. Biol.* 3: 707-712.
- Terras F. R. G., Torrekenes S., van Leuven F., Osborn R. W., Vanderleyden J., Cammue B. P. A., Broekaert W. F. 1993. A new family of basic cystein-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.* 316: 233-240.
- Thomma B. P. H. J., Cammue B. P. A., Thevissen K. 2002. Plant defensins. *Planta.* 216: 193-202.
- Van Loon L. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 4: 111-116.

SUMMARY

Inhibition of growth of the phytopathogenic organisms by Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) defensin

Plant-pathogen interactions have been studied extensively in horticultural crops but relatively little work has been done on tree pathosystems. To protect themselves against pathogen attack, plants produce a wide range of antimicrobial compounds, such as defensins. Defensins are the group of ubiquitous low-molecular weight proteins, which have a broad spectrum of biological activities. Recently, genes encoding defensin-like proteins, were identified in genomes of gymnosperms of *Picea* and *Ginkgo* orders and their expression in the roots of spruce seedlings was shown. We have developed a new approach for the purification of endogenous defensin from roots of Scots pine seedlings. This protein was isolated from the roots by sulphuric acid extraction, ammonium sulfate precipitation and chromatography on phosphocellulose. Scots pine defensin was tested in vitro for antifungal activity against *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *Alternaria alternata*. We found that this protein inhibited the growth of mycelium of the tested phytopathogenic fungi at concentration <5 µg/ml and caused morphological changes of hyphae.

The strong antifungal activity of Scots pine defensin towards pathogenic fungi opens for us the opportunity to develop new approaches for increasing innate resistance of conifers to infectious diseases.