

ROŚLINNE BIAŁKA PR W ODPOWIEDZI OBRONNEJ NA ATAK GRZYBÓW NEKROTROFICZNYCH*

PLANT PR PROTEINS IN THE DEFENSE RESPONSE
TO THE NECROTROPHIC FUNGI

Bartłomiej BYCZKOWSKI, Violetta Katarzyna MACIOSZEK,
Andrzej Kiejstut KONONOWICZ

Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Białka związane z patogenezą, zwane białkami PR (ang. *Pathogenesis-Related*) należą do grupy białek aktywowanych przede wszystkim w odpowiedzi obronnej roślin na atak patogenów, uszkodzenia spowodowane przez szkodniki oraz czynniki abiotyczne. Obecnie, na podstawie homologii sekwencji aminokwasów, właściwości biochemicznych i aktywności biologicznej wyróżnia się 17 rodzin białek PR, przy czym często wśród białek jednej rodziny występuje zróżnicowanie strukturalne i/lub funkcjonalne. Wiadomo, że podczas ataku patogena ekspresja i akumulacja specyficznych białek PR jest ściśle powiązana z typem patogena, typem komórki roślinnej oraz biosyntezą i aktywacją określonych cząsteczek sygnałowych: kwasu salicylowego (SA), kwasu jasmonowego (JA) i/lub etylenu (ET). Z tego względu białka PR często wykorzystuje się jako markery specyficznej odpowiedzi obronnej indukowanej w tkankach roślinnych. Należy jednak pamiętać, że część białek PR występuje w komórce roślinnej konstytutywnie, chociaż w niskim stężeniu. Niektóre z nich są gromadzone w komórkach na różnych etapach rozwoju rośliny, wykazując tkankowo-specyficzną lokalizację, inne tylko podczas indukcji wywołanej określonymi czynnikami stresowymi. Pomimo znacznego rozwoju metod fitopatologii molekularnej, mechanizm działania i funkcje wielu białek PR pozostają nadal niewyjaśnione. Możliwość wykorzystania białek PR, jako naturalnych substancji chroniących rośliny przed atakiem patogenów, otwiera nowe perspektywy w biotechnologii roślin, chociaż należy podkreślić, że niektóre z białek PR wywołują reakcje alergiczne u człowieka. W artykule przedstawiono wybrane rodziny białek PR – chitynazy (PR-4), defensyny (PR-12) oraz tioniny (PR-13), które wykazują właściwości antygrzybowe i których aktywność jest związana z odpowiedzią komórki roślinnej na atak grzybów nekrotroficznych, a ponadto są indukowane specyficznym w odpowiedzi obronnej roślin podczas aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od kwasu jasmonowego.

Słowa kluczowe: białka związane z patogenezą (PR), grzyby nekrotroficzne, kwas jasmonowy, odpowiedź obronna roślin.

*Praca finansowana z grantu MNiSzW N N302 3188 33. Udział BB i VKM w przygotowaniu niniejszej pracy był jednakowy.

Summary: Pathogenesis-related proteins belong to group of proteins activated during plant defense response to pathogen attack, insects and abiotic stress factors. Recently, 17 families of PR proteins have been classified based on their aminoacid sequences, biochemical properties and biological activity, but differences in structure and/or function between proteins which belong to one family are very often observed. Expression and accumulation of specific PR proteins is very precisely associated with the type of the pathogen, type of the plant cell, biosynthesis and activation of signaling compounds such as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and/or ethylene. For this reason, transcript levels of several PR genes can be used as markers of the specific defense response in plant tissues. It has to be emphasized that many PR proteins occur in plant cells constitutively, although at low concentration. Some of them appear in cells at different developmental stages and show tissue-specific localization, others can be only induced by the specific stress factors. Despite the progress in molecular phytopathology methods, mode of action and function of many PR proteins remain vague. Possibilities to exploit PR proteins as source of natural compounds in plant protection against pathogen attack open the new vistas in plant biotechnology. However, we have to be aware that some of the PR proteins can cause allergic reactions. In this paper, we describe selected families of PR proteins which show antifungal properties and which activity is associated with plant cell response to the necrotrophic fungi attack and additionally, we describe PR proteins that are induced specifically through the activation of JA-dependent signaling pathway.

Key words: jasmonic acid, necrotrophic fungi, pathogenesis-related (PR) proteins, plant defense response.

1. PODZIAŁ I ROLA BIAŁEK PR

Jednym z przełomowych wydarzeń otwierającym nowe perspektywy i wytyczającym nowe kierunki badań fitopatologii molekularnej była identyfikacja białka indukowanego specyficznie podczas odpowiedzi roślin tytoniu na atak wirusa mozaiki tytoniowej (TMV). Obecnie, na podstawie homologii sekwencji aminokwasów, właściwości biochemicznych i pełnionych funkcji wyróżnia się 17 rodzin białek PR, przy czym często wśród białek jednej rodziny występuje zróżnicowanie strukturalne i/lub funkcjonalne (tab. 1). Numery rodzin białek PR odnoszą się do kolejności, w jakiej były one zidentyfikowane i klasyfikowane [67]. Należy zwrócić uwagę, że pewne właściwości białek PR, szczególnie związane z aktywnością biologiczną, są wspólne dla większej liczby rodzin, czego przykładem mogą być rodziny PR-3, PR-4, PR-8 i PR-11, które przynajmniej funkcjonalnie zalicza się do chitynaz [23]. W miarę postępu badań była ujawniana m.in. wielofunkcyjność białek PR w procesach życiowych roślin. Przedstawiciele wielu rodzin białek PR, np. chitynazy [72] i β -glukanazy [16], są obecni w tkankach roślinnych konstytutywnie, zazwyczaj w niskim stężeniu. Ponadto, poziom akumulacji niektórych z białek PR jest zależny od stadium rozwojowego rośliny. Obecność niektórych białek PR-5 u bananowców, jabłoni i winorośli jest związana z dojrzewaniem owoców, są one również akumulowane podczas stresu solnego lub w obecności podwyższonego stężenia nadtlenu wodoru [33]. Poziom akumulacji białek z rodzin PR-2 i PR-3 w korzeniach zwiększa się wraz z wiekiem rośliny [50], natomiast obecność białek PR-10 wydaje się być konieczna dla prawidłowego rozwoju pyłku tytoniu i ryżu [70], a ponadto są one akumulowane w odpowiedzi na stres abiotyczny, wywołany m.in. obecnością w środowisku jonów metali ciężkich, takich jak Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} [58], a także w odpowiedzi na zranienie, suszę, stres oksydacyjny i promienie UV [44]. Ogromne

TABELA 1. Rodziny białek PR [67, zmodyfikowane]

TABLE 1. PR proteins families [67, modified]

Rodzina	Białko	Gatunek	Działanie	Literatura
PR-1*	PRb-1b	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nieznane	23
PR-2*	GLU	<i>Glycine max</i>	β -1,3-glukanazy	27
PR-3*	CHRK1 ChitB	<i>Vitis vinifera</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Chitynazy typu Ia, Ib, II, IV, VI, VII	6 30
PR-4**	Win1, Win4 CHIT1b, OsPR4 Zm PR4 HEL	<i>Triticum</i> spp. <i>Oryza sativa</i> <i>Zea mays</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Chitynazy typu I i II	14 5 4 30
PR-5*	Pru-TLP Mal-TLP SniOLP ATLP-1, ATLP-3 CaOSM1	<i>Prunus avium</i> <i>Malus domestica</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Capsicum annuum</i>	Taumatyno-podobne	50 33 43
PR-6	PR-6	<i>Petunia hybrida</i>	Inhibitory proteinaz	75
PR-7	P69B, P69G	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Endoproteinazy	36
PR-8*	CHIT3	<i>Vitis vinifera</i>	Chitynazy typu III	6
PR-9	TaPERO	<i>Triticum aestivum</i>	Peroksydazy	18
PR-10	CaPR-10 LaPR-10 OsPR-10	<i>Capsicum gossypium</i> <i>Lupinus albus</i> <i>Oryza sativa</i>	Rybonukleazo- podobne	44 13
PR-11*	PR-11	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Chitynazy typu V	65
PR-12**	PDF1.2 RsAFP2 DmAMP1	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Raphanus sativus</i> <i>Dahlia merckii</i>	Defensyny	49, 55 3 54, 62
PR-13**	β HTH, β PTH THI 2.1 MsDef1 Pp-AMP 1	<i>Pyricularia pubera</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Tulipa gesneriana</i>	Tioniny	60 73 54 26
PR-14*	AceAMP-1	<i>Daucus carota</i>	Białka przenoszące lipidy	34
PR-15	OxOa	<i>Hordeum vulgare</i>	Oksydazy szczawianowe	76
PR-16	OxOLP	<i>Hordeum vulgare</i>	Podobne do oksydaz szczawianowych	76
PR-17	Prp27	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nieznane	15

*i**Wskazują na rodziny białek PR o właściwościach przeciwgrzybowych; **rodziny białek PR przedstawione w artykule; ***Indicate PR proteins with antifungal properties; **PR families described in the paper

znaczenie dla biotechnologii roślin mają białka z rodzin PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-10 i PR-14, z których wiele zostało zidentyfikowanych jako czynniki alergenne dla ludzi, m.in. u brzozy (alergen *Bet v 1*), jabłoni (alergen *Mal d 1*) oraz tropikalnego drzewa kauczukowego, z którego wyizolowano alergen *Hev b 2* powszechnie występujący w lateksie [10, 29]. Większość chorób roślin uprawnych wywoływanych jest przez grzyby patogeniczne, dlatego wiele spośród wyizolowanych dotychczas białek PR ma właściwości antygrzybowe. Białka PR indukowane podczas infekcji roślin patogenami grzybowymi, a szczególnie nekrotrofami zalicza się do wielu rodzin (tab. 1), ale najczęściej badanymi podczas infekcji roślin grzybami nekrotroficznymi są przedstawiciele rodzin PR-4, PR-12 i PR-13. Właściwości antygrzybowe białek PR związane są przede wszystkim z enzymatyczną hydrolizą składników ścian komórkowych grzybów i lęgniowców (*Oomycetes*) – chityn (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) i β -glukanów (PR-2 i PR-5) [33]. Wykazano, że działanie obronne białek PR może być dodatkowo potęgowane poprzez współdziałanie białek pochodzących z różnych rodzin, np. synergistyczne działanie chitynaz z białkami przenoszącymi lipidy (PR-14) podczas infekcji wywołanych przez grzyby atakujące zielone części roślin [34]. W artykule przedstawiono wybrane rodziny białek PR – chitynazy (PR-4), defensyny (PR-12) oraz tioniny (PR-13), które wykazują właściwości antygrzybowe i których ekspresja jest związana z odpowiedzią komórki roślinnej na atak grzybów nekrotroficznych i są indukowane w ramach specyficznej odpowiedzi obronnej roślin podczas aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od kwasu jasmonowego.

2. SZLAK KWASU JASMONOWEGO I INDUKCJA BIAŁEK PR

Kwas jasmonowy jest jednym z głównych hormonów roślinnych zaangażowanych w procesy rozwojowe, a ponadto kluczowym składnikiem jednego z wariantów szlaków przekazywania sygnału w tkankach roślinnych podczas stresu biotycznego i abiotycznego, zarówno w lokalnej jak i systemicznej odpowiedzi [37]. Kwas jasmonowy jest końcowym produktem szlaku oktadekanowego. Został odkryty ponad 45 lat temu i rozpoznany, jako związek odpowiedzialny za zapach kwiatów jaśminu [48]. Pierwszymi etapami w szlaku oktadekanowym zachodzącymi w plastydach są przemiany kwasu linolenowego przy udziale takich enzymów, jak: lipooksygenaza (LOX), syntaza oksydazy allenowej (AOS) oraz cyklaza oksydazy allenowej (AOC), które prowadzą do powstania kwasu 12-oksofitynodienowego (OPDA). W cytoplazmie reduktaza OPDA (OPR3) redukuje strukturę enonową w pierścieniu OPDA, a następnie w peroksysomach zachodzą trzy etapy β -oksydacji, które prowadzą do powstania kwasu jasmonowego (kwas (+)-7-izojasmonowy) (szczegółowy opis biosyntezy kwasu jasmonowego w [19, 38, 69]). Zarówno kwas jasmonowy, jak i jego ester metylowy (MeJA) czy też OPR3 okazały się być istotnymi czynnikami regulującymi wzrost korzeni, dojrzewanie owoców, produkcję pyłku, a także ważnymi regulatorami szlaku sygnałowego zależnego od kwasu jasmonowego, związanego

zarówno ze stresem biotycznym, jak i abiotycznym [7, 40]. Mutanty *Arabidopsis thaliana cex1* i *cev1*, które wykazują konstytutywną produkcję jasmonianów i etylenu, charakteryzują się również konstytutywną ekspresją genów kodujących zasadową chitynazę *CHI*, tioninę *Thi2.1* oraz defensynę *PDF1.2* [21, 22, 56]. Białka te należą odpowiednio do rodzin PR-4, PR-13 oraz PR-12. Omawiane mutanty charakteryzują się zwiększoną odpornością na infekcję *Pseudomonas syringae*, co potwierdza kluczową rolę jasmonianów w regulacji ekspresji właśnie tych rodzin białek PR [7]. Synergistyczne działanie etylenu i kwasu jasmonowego potwierdzają eksperymenty z wykorzystaniem mutantów *coil* oraz *etr1*. Pierwszy charakteryzuje się niewrażliwością na koronatinę – analog etylovanego kwasu jasmonowego, a drugi brakiem wrażliwości na etylen. Rośliny *A. thaliana* z mutacją w genie *coil* wykazują całkowity brak odpowiedzi obronnej na infekcję *Alternaria brassicicola* i *Phytophthora irregularis*, indukowaną za pośrednictwem szlaku zależnego od kwasu jasmonowego i są bardziej podatne na atak tych patogenów [71]. Ostatnie badania dowiodły, że *coil* koduje kasetę F (*F-box*) niezbędną do tworzenia kompleksu SCF^{COI1}, który ma kluczowe znaczenie dla dalszego przekazywania sygnału i aktywacji między innymi białek PR, takich jak PDF1.2, HEL, b-CHI [48]. Otrzymanie podwójnego mutantu *coil:etr1* – dodatkowo niewrażliwego na etylen doprowadziło do identyfikacji etylenu, jako związku niezbędnego do ekspresji genu *PDF1.2* [19, 41]. Dodatkowymi elementami wpływającymi na interakcję pomiędzy szlakiem zależnym od kwasu jasmonowego a etylenem są czynniki transkrypcyjne, modulujące odpowiedź rośliny w zależności od rodzaju stresu. Przykładem może być gen *jin1*, który koduje czynnik transkrypcyjny AtMYC2 regulujący działanie dwóch dróg sygnałowych w obrębie szlaku zależnego od kwasu jasmonowego. AtMYC2 reguluje ekspresję genów związanych z odpowiedzią na patogeny, jak np. kodujących białka PR, a mutacja w tym genie prowadzi do zwiększonej odporności na patogeny nekrotroficzne [20, 46]. Ponadto, wykazano, że gen *mpk4* kodujący MAP kinazę 4 jest konieczny do indukcji ekspresji genów *PDF1.2* i *Thi2.1*, a mutacja polegająca na utracie funkcji MPK4 charakteryzuje się zwiększoną ekspresją białek PR (np. PR-1) indukowanych poprzez szlak zależny od kwasu salicylowego [11].

Indukcja białek PR odbywa się przede wszystkim poprzez działania cząsteczek sygnałowych: kwasu salicylowego (SA), kwasu jasmonowego (JA) i etylenu (ET), aktywowanych w zależności od specyficznych relacji pomiędzy rośliną i patogenem [11, 51]. Konsekwencją lokalnej odpowiedzi obronnej jest przekazywanie sygnału za pośrednictwem SA albo JA do tkanek leżących w pewnym oddaleniu od miejsca infekcji, co prowadzi do wykształcenia u rośliny nabytej odporności systemicznej – SAR (ang. *Systemic Acquired Resistance*) albo indukowanej systemicznej odporności – ISR (ang. *Induced Systemic Resistance*) przeciwko wielu różnym patogenom [28]. Ponadto akumulacja białek PR zależna od typu aktywnego szlaku sygnałowego pozwala na ich wykorzystanie, jako markerów specyficznej odpowiedzi indukowanej w tkankach roślinnych.

3. CHITYNAZY (PR-4)

Chitynazy syntetyzowane w komórkach roślinnych zostały podzielone na 7 klas (I–VII), które należą do kilku rodzin białek PR (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11, tab. 1). U podstaw takiego podziału leżą różnice w ich strukturze, specyficzności substratowej, mechanizmach działania i wrażliwości na inhibitory [72]. Początkowo uważano, że białka z rodziny PR-4 mają słabą aktywność endochitynazową i należą do większej grupy białek enzymatycznych hydrolizujących chitynę, ponieważ zidentyfikowano wiele związków odpowiadających tej charakterystyce, jak np. TuAMP1, TuAMP2 [26]. Obecnie pogląd ten ulega zmianie ze względu na wyizolowanie szeregu białek niezawierających domeny heweino-podobnej, która jest zaangażowana w łączenie się z chityną [4]. Do rodziny PR-4 zalicza się białka o aktywności chitynaz typu I oraz II, przy czym chitynazy typu I podzielono na dwie podklasy Ia i Ib [35, 72]. Chitynazy rodziny PR-4 należące do klasy I zawierają domenę heweino-podobną, wiążącą chitynę; natomiast chitynazy klasy II nie mają tej domeny [25]. Wiadomo, że chitynazy katalizują hydrolizę wiązań β -1,4-glikozydowych w polimerze N-acetylo-D-glukozaaminy, jaki stanowi chityna. Chityna jest rozpoznawana przez komórki roślinne jako elicytor, poprzez specyficzne receptory kinazopodobne LysM RLK (ang. *LysM Receptor-Like Kinase*). Wykazano, że mutacja w RLK1 u *Arabidopsis* powoduje zahamowanie ekspresji genów obronnych (m.in. chitynaz) prowadząc do podatności roślin na grzyby patogenne [68]. Ponadto, indukcja ekspresji genów kodujących chitynazy jest zależna od fitohormonów, takich jak kwas jasmonowy, ale również etylen, kwas salicylowy, auksyny, gibereliny [35]. Chitynazy mogą być wydzielane przez komórki roślinne do apoplastu (np. chitynazy Ib) lub zlokalizowane w wakuolach (chitynazy Ia) [72]. Białka PR-4 wyizolowano m.in. z tytoniu (CBP20), ziemniaka (StPR4), ryżu (OsPR4) czy kukurydzy (ZmPR4) [4]. Najlepiej poznanymi białkami należącymi do rodziny PR-4 są białka typu *wheatwin* (Win) o aktywności antygrzybowej przeciwko *Fusarium culmorum*, wyizolowane z *Triticum aestivum*. Mają one masę cząsteczkową 13–14 kDa, w ich budowie można wyróżnić sześć reszt cysteinowych odpowiedzialnych za tworzenie specyficznej struktury trzeciorzędowej gwarantującej aktywność enzymatyczną [5]. Wszystkie białka Win mają bardzo wysoki poziom homologii sekwencji, a w konsekwencji także struktury trzeciorzędowej. Przykładowo, *wheatwin1* różni się od *wheatwin2* dwoma resztami aminokwasowymi w pozycji 62 i 68, a *wheatwin2* od *wheatwin4* jedną resztą aminokwasową w pozycji 88. Ponadto, stwierdzono, że aktywność białek typu *wheatwin* może polegać na zmianie przepuszczalności ściany komórkowej grzyba podobnie jak ma to miejsce w przypadku białek PR-5 [13]. Wykazano również, że są one indukowane przez kwas salicylowy i jego homolog, pochodną benzotiadiazolu (BTH) i MeJA systemicznie, w sposób zależny zarówno od szlaku kwasu salicylowego, jak i jasmonowego [9]. Jednak, należy zaznaczyć, że w komórkach tytoniu linii BY-2 wykryto chitynazy TBC-1 i TBC-3, przypuszczalnie obie kodowane przez gen *NiChitIV*, które są indukowane przez elicytor *Alternaria alternata* o aktywności β -1,3-1,6 glukanu, ale zarówno SA, jak i JA powodują zahamowanie ekspresji tego genu i mają negatywny wpływ na aktywność chitynazową tych białek [59].

4. DEFENSYNY (PR-12)

Defensyny należą do grupy zasadowych białek o masie cząsteczkowej od 5 do 10 kDa i składają się z 45–54 aminokwasów [17]. Na podstawie badań mutantów oraz ekspresji i akumulacji takich białek, jak: PDF1.2, NaD1 i PgD1, uważa się, że defensyny są zawsze indukowane i syntetyzowane *de novo* poprzez szlak zależny od kwasu jasmonowego [56, 66, 73]. Charakterystyczną cechą tej rodziny jest specyficzna struktura trójwymiarowa, w której wyróżnia się trzy β -kartki oraz równoległą α -helisę, a rdzeń stanowi stabilizowany cysteinowo układ α -helisa/ β -kartka, zwany motywem CS $\alpha\beta$ [56, 64]. Cała struktura stabilizowana jest dodatkowo przez cztery mostki dwusiarczkowe, utworzone przez osiem połączonych ze sobą reszt cysteinowych, które wydają się odgrywać istotną rolę decydując o aktywności danego białka. W przypadku defensyny NaD1 z tytoniu wykazano, że rozerwanie mostków dwusiarczkowych prowadzi do utraty aktywności antygrzybowej [66]. Do jednych z najbardziej znanych defensyn należy PDF1.2, wyizolowana z *Arabidopsis thaliana*, która jest indukowana podczas infekcji roślin z rodziny *Brassicaceae* przez nekrotroficzny grzyba *Alternaria brassicicola* [55]. Należy ona do klasy defensyn, w skład której wchodzi przypuszczalnie aż 13 innych białek PDF, m.in. 1.1, 1.2, 1.5, 2.1, o różnym stopniu homologii, których kodujące geny znajdują się na chromosomach V i II *Arabidopsis thaliana* [64]. Obecnie, białko PDF1.2 jest uważane za marker odpowiedzi obronnej indukowanej przez szlak sygnałowy zależny od kwasu jasmonowego oraz etylenu. Dowodów na to dostarczyły badania, które wykazały, że promotor genu *PDF1.2* ulega indukcji pod wpływem działania kwasu jasmonowego, natomiast nie obserwowano żadnych zmian w poziomie ekspresji genu po traktowaniu roślin kwasem salicylowym lub jego homologami, takimi jak: INA (kwas izonikotynowy) czy BTH (pochodna benzotiadiazolu) [49]. Kolejne badania doprowadziły do identyfikacji w regionie promotora genu *PDF1.2* motywu zwanego kasetą GCC, który odpowiada za interakcje z czynnikami odpowiedzi na etylen – ERFs (ang. *Ethylene-Responsive Factors*) [12]. Zależny od jasmonianów ERF u *Arabidopsis* jest kluczowym czynnikiem regulującym ekspresję genów obronnych w tej roślinie, związanych z odpowiedzią na infekcję grzybami nekrotroficznymi [8, 53], a także wydaje się być konieczny do prawidłowej ekspresji wielu genów odpowiedzi obronnej zależnej od szlaku kwasu jasmonowego. Dowodzi tego obecność kasety GCC w promotorach nie tylko *PDF1.2*, ale także tioniny *Thi2.1* oraz zasadowej chitynazy *PR-4* [12, 47, 49, 57]. Oprócz kasety GCC ważnym czynnikiem regulującym ekspresję *PDF1.2* jest białko PROPEP1, które jest prekursorem czynnika AtPEP1. Mutanty wykazujące konstytutywną ekspresję *PROPEP1* charakteryzują się wyższą ekspresją *PDF1.2* oraz zwiększoną odpornością na patogeny [74]. Warto zaznaczyć, że ekspresja *AtPEP1*, a co za tym idzie także *PDF1.2* jest ściśle skorelowana z obecnością w tkankach odpowiedniego stężenia H₂O₂, czego dowiedziono badając rośliny traktowane DPI – inhibitorem oksydazy NADPH odpowiedzialnej za wytwarzanie w tkankach roślin reaktywnych form tlenu (RFT). Rośliny takie wykazywały obniżenie produkcji H₂O₂, czego konsekwencją

było zahamowanie ekspresji *AtPEP1* oraz *PDF1.2* [31, 32]. Badania porównawcze defensyn pochodzących z różnych gatunków znacznie od siebie oddalonych ewolucyjnie, wykazały uderzające podobieństwo strukturalne pomiędzy tymi białkami pochodzącymi z roślin, owadów oraz mięczaków, a także człowieka [2, 64]. Udowodniono, że defensyny będące produktami genów: *RsAFP2* *Raphanus sativus*, *DmAMP1* *Dahlia merckii* oraz heliomycyna, pochodząca z owada *Heliothis virescens* wykazują bardzo podobną aktywność biologiczną związaną z przyłączaniem się do komórek grzyba. Białka te, wiążąc się specyficznie ze strukturami błon komórkowych grzybów (sfingolipidami klasy (M(IP)2C) w przypadku białka *DmAMP1* [1] oraz glukozyloceramidami (GlcCer) w przypadku białka *RsAFP2* [3] i heliomycyny) powodują zmiany przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, indukują wpływ jonów Ca^{2+} oraz wypływ jonów K^+ , co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórek grzyba. Ponadto wiadomo, że interakcja *RsAFP2* ze strukturami ściany komórkowej (GlcCer) *Candida albicans* prowadzi do indukcji w mitochondriach grzyba reaktywnych form tlenu poprzez półprodukty procesu oddychania, co najprawdopodobniej potęguje toksyczny efekt tych związków, prowadząc do śmierci komórek drożdży [3, 63]. Wyjątkowo interesujące są wyniki badań nad defensyną NaD1 tytoniu, które wykazały, iż białko to łączy się ze strukturami ściany komórkowej *Fusarium oxysporum* i następnie wnika do wnętrza strzępek, powodując granulację cytoplazmy. Nadal jednak nie wiadomo, czy następująca po tym śmierć komórek grzyba jest wynikiem wypływu cytoplazmy, destabilizacji gradientu jonów czy obecnością defensyny [66]. Przykładem ilustrującym zróżnicowanie właściwości funkcjonalnych w obrębie rodziny białek PR-12 jest defensyna Ha-DEF1 *Helianthus annuus*, która oprócz aktywności antygrzybowej, ograniczającej wzrost *Alternaria brassicicola* oraz zmian w przepuszczalności błon komórkowych u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, również działa toksycznie na pasożytnicze rośliny z rodzaju *Orobanche* [17].

5. TIONINY (PR-13)

Tioniny należą do grupy małych białek bogatych w cysteinę, o masie cząsteczkowej około 5 kDa. Obecnie znanych jest około 100 sekwencji różnych tionin pochodzących z ponad 15 gatunków roślin. W rodzinie tych białek wyróżnia się dwie główne grupy: α/β -tioniny oraz γ -tioniny. Białka grupy α/β -tionin składają się z 45–49 aminokwasów. Podzielono je na 5 podgrup, które różnią się liczbą mostków dwusiarczkowych. Przedstawiciele podgrup I i II mają cztery mostki dwusiarczkowe, natomiast podgrup III i IV – tylko trzy. Białka należące do podgrupy V przypominają przycięte (ang. *truncated*) cząsteczki białek innych podgrup [60]. Osobną grupą są γ -tioniny, które wykazują znaczną homologię do defensyn i z tego względu przez wielu badaczy zaliczane są właśnie do tej grupy białek. Komplikuje to opracowanie jednoznacznej nomenklatury białek PR. Ze względu na strukturę pierwszorzędową, wzór rozmieszczenia mostków dwusiarczkowych i funkcje biologiczne γ -tioniny

podzielono na cztery podgrupy. Przedstawiciele podgrup I i II są cząsteczkami toksycznymi przede wszystkim dla bakterii i grzybów, podczas gdy białka podgrup III i IV wykazują zwiększoną toksyczność względem linii komórkowych ssaków. Podział ten jest jednak wysoce nieprecyzyjny, gdyż znane są przypadki białek grupy I i II wykazujących właściwości typowe dla grup III i IV i odwrotnie [54]. Uważa się, że tioniny powodują lizę fosfolipidów błony komórkowej patogena, prowadząc do jej gwałtownego i całkowitego zniszczenia [61]. Obecność w cząsteczkach tionin miejsc zdolnych do wiązania fosforanów oraz glicerolu zdaje się potwierdzać hipotezę, w myśl której docelowym elementem w komórkach patogena, na który działają te białka, jest błona komórkowa, co prowadzi do zaburzeń jej przepuszczalności [52]. Obecnie sądzi się, że regulacja ekspresji genów kodujących białka z rodziny tionin odbywa się przy udziale szlaku kwasu jasmonowego. Hipotezę tę potwierdzają badania z wykorzystaniem mutantów *Arabidopsis*, np. *cex1*, który wykazuje konstytutywną ekspresję kwasu jasmonowego i u którego wykryto znacznie podwyższony poziom *Thi2.1* [73]. Synteza tego białka nie jest natomiast indukowana w mutancie *coil*, niewrażliwym na kwas jasmonowy, a także po traktowaniu kwasem salicylowym [39]. Ważnym czynnikiem wpływającym na aktywność tionin jest obecność w środowisku jonów jedno- i dwuwartościowych. Stężenie jonów Ca^{2+} w wysokości 2–5 mM oraz 50 mM stężenie K^+ lub Na^+ są wystarczające do całkowitego zahamowania działania β -tionin, ponadto obecność jonów K^+ i Mg^{2+} powoduje dynamiczne zmiany konformacyjne w cząsteczkach α -tionin [52]. Działanie antygrzybowe tionin wykazano podczas infekcji *Arabidopsis thaliana* przez *Fusarium oxysporum*, gdzie u roślin wykazujących nadekspresję genu *Thi2.1* obserwowano ograniczenie wzrostu strzępek grzyba, a w konsekwencji redukcję biomasy grzyba i brak objawów chorobowych [24]. Ostatnio wykazano, że ekspresja genu *Thi2.1* z *Arabidopsis* w cielejcej linii komórkowej BVE-E67E7 powodowała odporność tych komórek nie tylko na szczepy patogenicznych bakterii, ale również wywoływała zahamowanie wzrostu *Candida albicans* o 80% w stosunku do komórek kontrolnych [45].

6. BIAŁKA PR INNYCH RODZIN WYKAZUJĄCE WŁAŚCIWOŚCI ANTYGRZYBOWE

Chitynazy, tioniny i defensyny nie są jedynymi białkami PR, które wykazują właściwości antygrzybowe. Ważną rolę w odpowiedzi rośliny na infekcję pełnią również przedstawiciele innych rodzin białek PR, m.in. PR-5, PR-10 lub PR-14. Jednak ich aktywność podczas ataku nekrotrofów nie została dotychczas ustalona. W świetle obecnych badań uważa się, że obecność tych białek w komórce roślinnej jest związana z ich właściwościami antibakteryjnymi i/lub antygrzybowymi. Przykładem mogą być zeamatyna oraz osmotyna z rodziny PR-5, zwanej także rodziną białek taumatyno-podobnych –TLPs (ang. *Thaumatococin-Like Proteins*) ze względu na podobieństwa strukturalne jej przedstawicieli do słodkiego białka taumatyny,

wyzolowanego z *Thaumatococcus daniellii* [42]. Niektórzy przedstawiciele tej rodziny wykazują właściwości typowe dla endo- β -1,3-glukanaz, za co hipotetycznie może odpowiadać ich ujemny ładunek oraz kwasowe zagłębienie w strukturze przestrzennej cząsteczek takich białek, jak np. Pru-TLP, Mal-TLP czy HvPR5c [33, 50]. Białkami PR działającymi na struktury ścian komórkowych grzybów są także przedstawiciele rodziny PR-14, do której należą białka przenoszące lipidy – LTPs (ang. *Lipid Transfer Proteins*). Są to małe peptydy zawierające sekwencje sygnałowe kierujące je do ścian komórek roślinnych i biorące udział w budowie warstwy woskowej, wykazujące także wyraźne działanie antygrzybowe. Uważa się, że ich właściwości są związane ze zmianami przepuszczalności błony, a wskazywać na to może ich wysoki punkt izoelektryczny [34]. Przykładem odbiegającym od przedstawionych powyżej są białka należące do rodziny PR-10. Liczni przedstawiciele tej rodziny zostali podzieleni na dwie klasy: białka wewnątrzkomórkowe związane z patogenezą – IPR (ang. *Intracellular Pathogenesis-Related*) oraz syntazy (S)-nor-koklauryny – NCSs (ang. *(S)-Norcochlorine Synthases*). Działanie obronne białek PR-10 polega na aktywności rybonukleaz typu I i II. Wykazano, że dwa białka PR-10 homologiczne do RNazy1 i 2 żeńszenia działają toksycznie między innymi na takie grzyby, jak *Aspergillus flavus* i *Colletotrichum trifolii* [44].

7. PODSUMOWANIE

Białka PR to liczna i skomplikowana funkcjonalnie i strukturalnie grupa białek, które w dużej mierze nadal pozostają niezbadane. Przede wszystkim wyjaśnienia wymaga mechanizm działania tych białek na komórki patogenów, a szczególnie nekrotroficznych grzybów, które każdego roku wywołując epidemie roślin zielnych i drzewiastych są przyczyną wielomilionowych strat w rolnictwie i leśnictwie. Ponadto, duże nadzieje związane są z badaniami, które mają na celu wykorzystanie roślinnych białek PR jako farmaceutyków w terapiach przeciwgrzybiczych u ludzi. Jednak dopóki nie zostanie poznana struktura domenowa, funkcja i mechanizm działania tych białek, pozostanie to projektem na przyszłość.

LITERATURA

- [1] AERTS AM, FRANÇOIS IE, BMMENS L, CAMMUE BP, SMETS B, WINDERICKX J, ACCARDO S, DE VOS DE, THEVISSSEN K. Level of M(IP)2C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. *FEBS Lett* 2006; **580**: 1903–1907.
- [2] AERTS AM, FRANCOIS IEJA, CAMMUE BPA, THEVISSSEN K. The mode of action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 2069–2079.
- [3] AERTS AM, FRANCOIS IEJA, MEERT EMK, LI QT, CAMMUE BPA, THEVISSSEN K. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007, **13**: 243–247.
- [4] AGRAWAL GK, JWA NS, HAN KS, AGRAWAL VP, RAKWAL R. Isolation of a novel rice PR4 type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components. *Plant Physiol Biochem* 2003; **41**: 81–90.

- [5] ALTENBACH SB, KOTHARI KM, TANAKA CK, HURKMAN WJ. Genes encoding the PR-4 protein, wheatwin, are developmentally regulated in wheat grains and respond to high temperatures during grainfill. *Plant Sci* 2007; **173**: 135–143.
- [6] AZIZ A, HEYRAUD A, LAMBERT B. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defence-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* 2004; **218**: 767–774.
- [7] BALBI V, DEVOTO A. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol* 2008; **177**: 301–318.
- [8] BERROCAL-LOBO M, MOLINA A, SOLANO R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* 2002; **29**: 23–32.
- [9] BERTINI L, LEONARDI L, CAPORALE C, TUCCI M, CASCONI N, BERARDINO ID, BUONOCORE V, CARUSO C. Pathogen-responsive wheat PR-4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding. *Plant Sci* 2003; **164**: 1067–1078.
- [10] BREITENEDER H, EBNER C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **106**: 27–36.
- [11] BRODERSEN P, PETERSEN M, NIELSEN HB, ZHU S, NEWMAN MA, SHOKAT K, RIETZ S, PARKER J, MUNDY J. *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* 2006; **47**: 532–546.
- [12] BROWN R, KAZAN K, MCGRATH K, MACLEAN D, MANNERS J. A role of GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1020–1032.
- [13] CAPORALE C, BERARDINO ID, LEONARDI L, BERTINI L, CASCONI A, BUONOCORE V, CARUSO C. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *FEBS Lett* 2004; **575**: 71–76.
- [14] CAPORALE C, FACCHIANO A, BERTINI L, LEONARDI L, CHILOSI G, BUONOCORE V, CARUSO C. Comparing the modeled structures of PR-4 from wheat. *J Mol Model* 2003; **9**: 9–15.
- [15] CHRISTENSEN AB, HO CB, NAESBY M, GREGERSEN PL, BRANDT J, WADRIZ-ORDENANA K, COLLINGE DB, THORDAL-CHRISTENSEN H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathol* 2002; **3**: 135–144.
- [16] COTA LE, TRONCOSO-ROJAS R, SOTELO-MUNDO R, SANCHES-ESTRADA A, TINZADO-HERNANDEZ ME. Chitinase and β -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Sci Hortic* 2007; **112**: 42–50.
- [17] DE ZELICOURT A, LETOUSEY P, THOIRON S, CAMPION C, SIMONEAU P, ELMORJANI K, MARION D, SIMIER P, DELAVAUPT P. Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanchaceae* parasitic plants. *Planta* 2007; **226**: 591–600.
- [18] DESMOND OJ, EDGAR CI, MANNERS JM, MACLEAN DJ, SCHENK PM, KAZAN K. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 2006; **67**: 171–179.
- [19] DEVOTO A, TURNER JG. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann Bot* 2003; **92**: 329–337.
- [20] DOMBRECHT B, XUE GP, SPRAGUE SJ, KIRKEGAARD JA, ROSS JJ, REID JB, FITT GP, SEWELAM N, SCHENK PM, MANNERS JM, KAZAN K. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 2225–2245.
- [21] ELLIS C, KARAFYLLIDIS I, WASTERACK C, TURNER J. The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signalling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 2002; **14**: 1557–1566.
- [22] ELLIS C, TURNER JG. The *Arabidopsis* Mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* 2001; **13**: 1025–1033.
- [23] ELVIRA MI, GALDEANO MM, GILARDI P, GARCIA-LUQUE I, SERRA MT. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L³ plants. *J Exp Bot* 2008; **59**: 1253–1265.
- [24] EPPLE P, APEL K, BOHLMANN H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 1997; **9**: 509–520.
- [25] FERREIRA RB, MONTEIRO S, FREITAS S, SANTOS CN, CHEN Z, BATISTA LM, DUARTE J, BORGES A, TEIXEIRA AR. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol Plant Pathol* 2007; **8**: 677–700.

- [26] FUJIMURA M, IDEGUCHI M, MINAMI Y, WATANABE K, TADERA K. Purification, characterization and sequencing of novel antimicrobial peptides, Tu-AMP1 and Tu-AMP2, from bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; **68**: 571–577.
- [27] GRAHAM MY, WEIDNER J, WHEELER K, PELOW MJ, GRAHAM TL. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiol Mol Plant Pathol* 2003; **63**: 141–149.
- [28] HEIL M, TON J. Long distance signaling in plant defence. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 264–272.
- [29] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 930–934.
- [30] HOSSAIN MM, SULTANA F, KUBOTA M, HYAKUMACHI M. Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growth-promoting-fungus *Penicillium* sp. GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant Soil* 2008; **304**: 227–239.
- [31] HUFFAKER A, PEARCE G, RYAN CA. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 10098–10103.
- [32] HUFFAKERA, RYAN CA. An endogenous peptide signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10732–10736.
- [33] JAMI SK, ANURADHA TS, GURUPRASAD L, KIRTI PB. Molecular biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). *J Plant Physiol* 2007; **164**: 238–252.
- [34] JAYARAY J, PUNJA ZK. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Rep* 2007; **26**: 1539–1546.
- [35] KASPRZEWSKA A. Plant chitinases – regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 2003; **8**: 809–824.
- [36] KAVROULAKIS N, NTOUGIAS S, ZERVAKIS GI, EHALIOTIS C, HARALAMPIDIS K, PAPADOPOULOU KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot* 2007; **58**: 3853–3864.
- [37] KAZAN K, MANNERS JM. Jasmonate signaling: Toward an integrated view. *Plant Physiol* 2008; **146**: 1459–1468.
- [38] KIENOW L, SCHNEIDER K, BARTSCH, STUIBLE HP, WENG H, MIERSCH O, WASTERNAK C, KOMBRINK E. Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2008; **59**: 403–419.
- [39] KITANAGA Y, JIAN C, HASEGAWA M, YAZAKI J, KISHIMOTO N, KIKUCHI S, NAKAMURA H, ICHIKAWA H, ASAMI T, YOSHIDA S, YAMAGUCHI I, SUZUKI Y. Sequential regulation of gibberellin, brassinosteroid and jasmonic acid biosynthesis occurs in rice coleoptiles to control the transcript levels of anti-microbial thionin genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; **70**: 2410–2419.
- [40] KRÓL P, KĘPCZYŃSKA E. Rola jasmonianów w indukowanej systemicznej odporności roślin przeciwko patogenom. *Biotechnologia* 2008; **80**: 122–135.
- [41] KUNKEL BN, BROOKS DM. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**: 325–331.
- [42] KYU HJ, WON JH, KOOK LB, CHUL LS, KYEONG LY, KOOK HGB. An osmotin-like protein gene, CAOSM1, from pepper: Differential expression and *in situ* localization of its mRNA during pathogen infection and abiotic stress. *Physiol Mol Plant Pathol* 2004; **64**: 301–310.
- [43] LEE SC, HWANG BK. Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta* 2005; **221**: 790–800.
- [44] LIU JJ, EKRAMODDOULLAH KM. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol* 2006; **68**: 3–13.
- [45] LOEZA-ÁNGELES A, SAGRERO-CISNEROS E, LARA-ZÁRATE L, VILLAGÓMEZ E, LÓPEZ-MEZA JE, OCHOA-ZARZOSA A. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol Lett* 2008; **30**: 1713–1719.
- [46] LORENZO O, CHICO JM, SANCHEZ-SERRANO JJ, SOLANO R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 1938–1950.
- [47] LORENZO O, PIQUERAR, SANCHEZ-SERRANO JJ, SOLANO R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 2003; **15**: 165–178.

- [48] LORENZO O, SOLANO R. Molecular players regulating the jasmonate signaling network. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 532–540.
- [49] MANNERS JM, PENNINGKX IAMA, VERMAERE K, KAZAN K, BROW RL, MORGANA, MACLEAN DJ, CURTIS MD, CAMMUE BPA, BROEKAERT WF. The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 1071–1080.
- [50] MENU-BOUAOUICHE L, VRIET C, PEUMANS W J, BARRE A, VAN DAMME EJM, ROUGE P. A molecular basis for endo- β 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* 2003; **85**: 123–131.
- [51] MUR LAJ, KENTON P, ATZORN R, MIERSCH O, WASTERNAK C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 2006; **140**: 249–262.
- [52] OARD S, KARKI B, ENRIGHT F. Is there a difference in metal ion-based inhibition between members of thionin family? Molecular dynamics simulation study. *Biophys Chem* 2007; **130**: 65–75.
- [53] ONATE-SANCHEZ L, ANDERSON JP, YOUNG J, SINGH KB. AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiol* 2007; **143**: 400–409.
- [54] PELEGRINI PB, FRANCO OL. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multifunctional class of defense proteins. *Inter J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 2239–2253.
- [55] PENNINGKX IAMA, EGGERMONT K, TERRAS FRG, THOMMA BPHJ, DE SAMBLANX GW, BUCHALAA, MÉTRAUX J-P, MANNERS JM, BROEKAERT WF. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 1996; **8**: 2309–2323.
- [56] PERVIEUX I, BOURASSAM, LAURANS F, HAMELIN R, SEGUIN A. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatment. *Physiol Mol Plant Pathol* 2004; **64**: 331–341.
- [57] PRÉ M, ATALLAH M, CHAMPION A, DE VOS M, PIETERSE CMJ, MEMELINK J. The AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* 2008; **147**: 1347–1357.
- [58] PRZYMUSIŃSKI R, RUCIŃSKA R, GWÓŹDŹ EA. Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. *Environ Exp Bot* 2004; **52**: 53–61.
- [59] SHINYA T, HANAI K, GALIS I, SUZUKI K, MATSUOKAK, MATSUOKAH, SAITO M. Characterization of NtChitIV, a class IV chitinase induced by β -1,3-, 1,6-glucan elicitor from *Alternaria alternata* 102: Antagonistic effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the induction of NtChitIV. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **353**: 311–317.
- [60] STEC B. Plant thionins – the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 1370–1385.
- [61] STEC B, MARKMAN O, RAO U, HEFFRON G, HENDERSON S, VERNON LP, BRUMFELD V, TETER MM. Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physic-chemical studies of plant toxins. *J Peptide Res* 2004; **64**: 210–224.
- [62] THEVISSSEN K, FRANCOIS IEJA, TAKEMOTO JY, FERKET KKA, MEERT EMK, CAMMUE BPA. DmAMPI, an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2003; **226**: 169–173.
- [63] THEVISSSEN K, KRISTENSEN H, THOMMA BPHJ, CAMMUE BPA, FRANCOIS IEJA. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov Today* 2007; **12**: 966–971.
- [64] THOMMA BPHJ, CAMMUE BPA, THEVISSSEN K. Plant defensins. *Planta* 2002; **216**: 193–202.
- [65] VAN DAMME EJM, CULERRIER R, BARRE A, ALVAREZ R, ROUGÉ P, PEUMANS WJ. A novel family of lectins evolutionary related to class V chitinases: An example of neofunctionalization in legumes. *Plant Physiol* 2007; **144**: 662–672.
- [66] VAN DER WEERDEN, LAY FT, ANDERSON MA. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *J Biol Chem* 2008; **283**: 14445–14452.
- [67] VAN LOON LC, REP M, PIETERSE CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 2006; **44**: 135–162.
- [68] WAN J, ZHANG X-C, NEECE D, RAMONELL KM, CLOUGH S, KIM S-Y, STACEY MG, STACEY G. A LysM receptor-like kinase plays critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008; **20**: 471–481.
- [69] WASTERNAK C. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 2007; **100**: 681–697.

- [70] WORRALL D, HIRD DL, HODGE R, PAUL W, DRAPER J, SCOTT R. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1994; **4**: 759–771.
- [71] XIAO S, DAI L, LIU F, WANG Z, PENG W, XIE D. COI1: An *Arabidopsis coronatine insensitive1* suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 2004; **16**: 1132–1142.
- [72] XU F, FAN C, HE Y. Chitinases in *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *Arabidopsis thaliana*. *J Genet Genomics* 2007; **34**: 138–150.
- [73] XU L, LIU F, WANG Z, PENG W, HUANG R, HUANG D, XIE D. An *Arabidopsis* mutant *cex1* exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated AtVSP, Thi2.1 and PDF 1.2. *FEBS* 2001; **494**: 161–164.
- [74] YAMAGUCHI Y, PEARCE G, RYAN CA. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPEP1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 10104–10109.
- [75] ZAHN M, WIMALASEKARA R, GÖBEL C, FEUSSNER I, HOLK A, SCHERER GFF. Expression of *Arabidopsis* phospholipase A genes in *Petunia* x hybrid. Increased hypersensitive-like response after infection with *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 demonstrates a function for phospholipase A in pathogen defense. *Physiol Mol Plant Pathol* 2005; **67**: 2–14.
- [76] ZHOU F, ZHANG Z, GRÉGERSEN PL, MIKKELSEN JD, DE NEERGAARDE E, COLLINGE DB, THOR-DAL-CHRISTENSEN H. Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol* 1998; **117**: 33–41.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 14.01. 2009 r.

Przyjęto: 20.02. 2009 r.

*Andrzej K. Kononowicz, Katedra Genetyki Ogólnej,
Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Łódzki,
ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: akononow@biol.uni.lodz.pl*